



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**PROSPECÇÃO E USO DE CULTURAS LÁCTICAS COMO INOCULANTE NA**  
**ENSILAGEM DE PALMA FORRAGEIRA**

**GILDENIA ARAÚJO PEREIRA**

**AREIA-PB**  
**MARÇO – 2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**PROSPECÇÃO E USO DE CULTURAS LÁCTICAS COMO INOCULANTE NA**  
**ENSILAGEM DE PALMA FORRAGEIRA**

**GILDENIA ARAÚJO PEREIRA**  
ZOOTECNISTA

**AREIA-PB**  
**MARÇO – 2019**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

P436p Pereira, Gildenia Araujo.

Prospecção e uso de culturas lácticas como inoculante  
na ensilagem de palma forrageira / Gildenia Araujo  
Pereira. - AREIA, 2019.  
94 f. : il.

Orientação: Edson Mauro Santos Santos.  
Coorientação: Juliana Silva de Oliveira Oliveira.  
Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. cactácea. 2. ensilagem. 3. Lactobacillus plantarum.  
4. ruminante. I. Santos, Edson Mauro Santos. II.  
Oliveira, Juliana Silva de Oliveira. III. Título.

UFPB/CCA-AREIA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE TESE

TÍTULO: "PROSPECÇÃO E USO DE CULTURAS LÁTICAS COMO  
INOCULTANTE NA ENSILAGEM DE PALMA FORRAGEIRA"


AUTOR: GILDENIA ARAÚJO PEREIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Mauro Santos

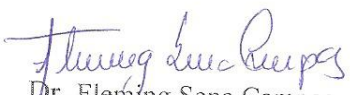
JULGAMENTO


CONCEITO: APROVADO

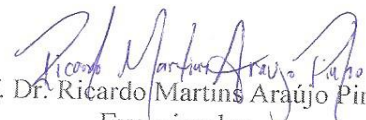
EXAMINADORES:

  
Prof. Dr. Edson Mauro Santos  
Presidente  
Universidade Federal da Paraíba

  
Dr. Alexandre Fernandes Perazzo  
Examinador  
Universidade Federal da Paraíba/ PNPD

  
Dr. Fleming Sena Campos  
Examinador  
Universidade Federal Rural de Pernambuco/ PNPD

  
Prof. Dr. Ossival Lobato Ribeiro  
Examinador  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

  
Prof. Dr. Ricardo Martins Araújo Pinho  
Examinador

Instituto Federal de Educação Ciências e Tecnologia do Rio Grande do Norte

Areia, 22 de fevereiro de 2019

*Confia no Senhor e faze o bem;  
habitarás na terra, e verdadeiramente serás alimentado.  
Deleita-te também no Senhor, e te concederá os desejos do teu coração.  
Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e ele tudo fará.  
Salmos 37. 3-5*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida e pela força necessária para perseverar na busca pelos meus objetivos;

Aos meus amados pais, Joaquim e Damiana, por ser exemplos de força, coragem e fé;

A meus irmãos, Gildevan, Geane e Juliana, pela amizade, paciência e amor;

Aos meus sobrinhos Ana Julia, Luiza, João Victor e José Artur que são a alegria da minha vida;

Aos meus avôs Manoel e Paulina por todo amor e carinho;

A Jucie, pela paciência, companherismo e incentivo;

Ao meu orientador, Professor Dr. Edson Mauro pela, dedicada, honesta e sábia orientação.

Aos meus coorientadores, professora Juliana Silva de Oliveira e professor Dr.

Gherman Garcia Leal de Araújo pelas colaborações.

Agradeço em especial a Ricardo Martins, Maria Eleonor, Alexandre Perazzo, Raniere Paulino, João Paulo, José Maria, Karen, Joyce e Gabriel

Aos amigos que compartilharam comigo esta fase tão importante, Jessica, Francinilda, Fátima, Jaciara, Raimundo, Lavosier

Ao GEF, pela fundamental colaboração na realização deste trabalho;

A todos funcionários da Empresa de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA – PB).

Ao Programa de pós graduação em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

## **SUMÁRIO**

LISTA DE TABELAS E FIGURA .....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO GERAL .....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 A cultura da palma forrageira.....	12
2.2 Silagem de palma forrageira.....	14
2.3 Inoculantes bacterianos como aditivos na silagem.....	17
2.4 Perfil fermentativo, estabilidade aeróbia e valor nutritivo .....	19
2.5 Impacto da silagem no consumo e digestibilidade dos nutrientes.....	22
2.6 Inoculantes como probióticos para ruminantes .....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27
CAPÍTULO I.....	42
Seleção de bactérias lácticas na planta e na silagem de <i>Nopalia spp.</i> e seus efeitos na fermentação e estabilidade aeróbia da silagem.....	42
RESUMO.....	43
ABSTRACT .....	44
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1. Isolamento e caracterização de BAL a partir de silagem e da planta de palma forrageira .....	45
2.1.1. Localização e preparação da silagem .....	45
2.1.2. Isolamento e identificação de BAL .....	46
2.1.3. Pré-seleção de estirpes de BAL com base na produção de metabólitos no caldo MRS .....	47
2.2. Avaliação das estirpes nas silagens experimentais.....	48
2.2.1. preparação de silagem .....	48
2.2.2. Coleta de amostras.....	48
2.3. Análise estatística .....	50
3. RESULTADOS .....	50
3.1. Isolamento, identificação e pré-seleção de estirpes de BAL .....	50
3.2. Perda de MS e perfil fermentativo.....	50
3.2.2. Características químicas e microbiológicas da silagem .....	51
4. DISCUSSÃO .....	51
5. CONCLUSÕES.....	55
6. REFERÊNCIAS .....	55
CAPÍTULO II.....	68
RESUMO.....	69
ABSTRACT .....	70
INTRODUÇÃO.....	70
MATERIAL E MÉTODOS.....	72
RESULTADOS .....	78
DISCUSSÃO.....	79
CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS .....	82

## LISTA DE TABELAS E FIGURA

### CAPÍTULO I

<b>TABELA 1.</b> Morfologia e características bioquímicas dos isolados da planta e da silagem de palma forrageira.....	59
<b>TABELA 2.</b> Composição química e populações microbianas em palma forrageira antes da ensilagem.....	60
<b>TABELA 3.</b> Conteúdo (mg / dm <sup>3</sup> ) de ácido láctico, ácido acético, relação ácido láctico / ácido acético e pH por estirpes de BAL em caldo MRS.....	61
<b>TABELA 4.</b> Isolados, similaridade de espécies bacterianas e código de acesso ao GenBank de BAL isolados de palma forrageira e silagens. ....	62
<b>TABELA 5.</b> Efeitos do inoculante microbiano nas perdas de gás e efluente e na recuperação de matéria seca da silagem de palma.....	63
<b>TABELA 6.</b> Efeitos do inoculante microbiano sobre as concentrações de ácido láctico (AL), ácido acético (AA), ácido propiônico (AP), ácido butírico (AB), relação ácido láctico para ácido acético (AL/ AA), carboidratos solúveis em água (CSA) , nitrogênio amoniacal (N-NH <sub>3</sub> ) e capacidade tampão (CT) de silagem de palma.....	65
<b>TABELA 7.</b> Efeitos do inoculante microbiano na composição química (g / kg de MS) da silagem de palma .....	66
<b>TABELA 8.</b> Efeitos do inoculante microbiano em populações microbianas (log cfu / g silagem) e estabilidade aeróbia da silagem de palma .....	67

### CAPÍTULO II

<b>TABELA 1-</b> Composição bromatológica dos ingredientes utilizados para compor as dietas experimentais.....	87
<b>TABELA 2-</b> Proporções dos ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais utilizadas na alimentação de ovinos alimentados com palma forrageira <i>in natura</i> e silagem com e sem inoculante .....	88
<b>TABELA 3-</b> Consumo de nutrientes por ovinos alimentados com palma <i>in natura</i> e silagem de palma forrageira.....	89
<b>TABELA 4-</b> Coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes (g/kg) de dietas com palma forrageira <i>in natura</i> e silagem de palma forrageira com e sem inoculante para ovinos SPRD .....	90
<b>TABELA 5-</b> Balanço nitrogenado e síntese de proteína microbiana em ovinos alimentados com palma <i>in natura</i> e silagem de palma forrageira .....	91
<b>GRÁFICO 1-</b> Contagem de enterobactérias nas fezes dos ovinos alimentados com palma <i>in natura</i> e silagem de palma forrageira .....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS



- ❖ AL, ácido láctico;
- ❖ AA, ácido acético;
- ❖ AP, ácido propiônico;
- ❖ AB, ácido butírico;
- ❖ BAL, bactéria ácido láctica;
- ❖ CT, capacidade tamponante;
- ❖  $\text{CaCO}_3$ , Carbonato de cálcio;
- ❖ CIDN, cinza insolúvel em detergente neutro;
- ❖ DNA, ácido desoxirribonucleico;
- ❖ EE, extrato etéreo;
- ❖ EDTA, Ácido etileno de aminotetracético (“Ethylenediaminetetracetic acid”)
- ❖ FDA, fibra insolúvel em detergente ácido ;
- ❖ FDNcp, fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína;
- ❖ MM, matéria mineral;
- ❖ MS, matéria seca;
- ❖ MRS, Man-Rogosa-Shape
- ❖ NDT, nutrientes digestíveis totais;
- ❖  $\text{NH}_3/\text{NT MS}$ , nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total na matéria seca;
- ❖ PB, proteína bruta;
- ❖ PIDN, proteína insolúvel em detergente neutro;
- ❖ PIDA, proteína insolúvel em detergente ácido;
- ❖ PCR, Reação em Cadeia da Polimerase (“Polimerase Chain Reaction”)
- ❖ PG, perdas por gases;
- ❖ PE, perdas por efluentes;
- ❖ RMS, recuperação de matéria seca;
- ❖ SPRD, sem padrão racial definido;
- ❖ UFC, unidades formadoras de colônias
- ❖ CSA, carboidratos solúveis em água;
- ❖ ML, mofos e leveduras;

**Prospecção e uso de culturas lácticas como inoculante na ensilagem de palma  
forrageira**

## RESUMO

Este estudo envolveu dois experimentos. No primeiro, o objetivo foi selecionar estirpes de bactérias ácido-láticas (BAL) isoladas da planta e da silagem de palma forrageira e avaliar seus efeitos na fermentação e estabilidade aeróbia de silagens de palma. Quarenta isolados classificados como BAL foram isolados da planta e da silagem de palma forrageira e avaliados quanto à produção de metabólitos e identificados por meio do sequenciamento do 16S rDNA. Os isolados foram identificados como *Lactobacillus plantarum*, *Weissella cibaria*, *Weissella confusa* e *Weissella paramesenteroides*. A população de bactérias do ácido láctico (BAL), carboidratos solúveis em água (CSA) e nitrogênio amoniacal diferiram ( $P < 0,001$ ) entre as silagens. As populações de enterobactérias, leveduras e fungos estavam abaixo do limite mínimo de detecção ( $< 2,0 \log \text{ ufc / g}$  de silagem) em todas as silagens estudadas. A ação predominante dos inoculantes foi a maximização da recuperação de MS das silagens, que poderia ser o critério adotado para selecionar as estirpes de BAL para uso como inoculantes nas silagens de palma. No segundo experimento, o objetivo foi comparar a palma *in natura* e ensilada com e sem inoculante microbiano na dieta de ovinos, por meio da avaliação do consumo, digestibilidade de nutrientes, balanço nitrogenado e síntese de proteína microbiana, bem como contagem de enterobactérias fecais. Foram utilizados 20 ovinos sem padrão racial definido, não-castrados com aproximadamente 6 meses de idade e peso inicial médio de  $23,48 \pm 2,40$  kg. Os animais foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (Palma forrageira *in natura* processada duas vezes ao dia, na hora do fornecimento (PF1); palma forrageira *in natura* processada uma única vez pela manhã e fornecida duas vezes ao dia (PF2); silagem de palma sem inoculante (SPF); silagem de palma com inoculante microbiano (SPFI) e cinco repetições. O período experimental teve duração de 21 dias. A utilização da palma forrageira na forma de silagem (SPF e SPFI) resultou em maiores ( $P < 0,05$ ) consumos de matéria seca, matéria orgânica, fibra em detergente neutro, extrato etéreo, carboidratos não fibrosos e nutrientes digestíveis totais, além de maiores coeficientes de digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica, bem como dos nutrientes digestíveis totais. Observou-se também menores contagens de enterobactérias fecais. Por outro lado, não foi verificado efeito ( $P > 0,05$ ) das dietas sobre o balanço de nitrogênio, eficiência microbiana, perdas do nitrogênio urinário e fecal e eficiência microbiana. A utilização da silagem de palma forrageira promove redução na contagem de enterobactérias, melhorando o consumo e digestibilidade dos nutrientes.

**Palavras-chave:** cactácea, ensilagem, *Lactobacillus plantarum*, ruminante

**Prospection and use of thermal cultures as an inoculant in the cactus pear**

**ABSTRACT**

This study involved two experiments. In the first, the objective was to select strains of lactic acid bacteria (BAL) isolated from the plant and cactus pear silage and to evaluate its effects on silage fermentation and aerobic stability. Forty isolates classified as BAL were isolated from the plant and forage palm silage and evaluated for the production of metabolites and identified by 16S rDNA sequencing. Isolates were identified as *Lactobacillus plantarum*, *Weissella cibaria*, *Weissella confusa* and *Weissella paramesenteroides*. The population of lactic acid bacteria (BAL), water soluble carbohydrates (WSC) and ammoniacal nitrogen differed ( $P < 0.001$ ) among the silages. Enterobacterial, yeast and fungal populations were below the minimum detection limit ( $< 2.0 \log \text{ cfu / g silage}$ ) in all silages studied. The predominant action of the inoculants was the maximization of the recovery of DM of the silages, which could be the criterion adopted to select the BAL strains for use as inoculants in the Nopalía silages. In the second experiment, the objective was to compare the in natura and ensiled cactus pear with and without microbial inoculant in the sheep diet, through the evaluation of the consumption, nutrient digestibility, nitrogen balance and microbial protein synthesis, as well as fecal enterobacteria count. Twenty sheep with no defined racial pattern were defined, non-castrated at approximately 6 months of age and mean initial weight of  $23.48 \pm 2.40 \text{ kg}$ . These were distributed in a completely randomized design with four treatments (forage palm in natura processed twice a day at the time of supply (PF1); fresh cactus pear processed once only in the morning and supplied twice a day (PF2) (SPI) and silage (SP and SPI) resulted in a higher number of silage species (SPI and SPI), as well as in silage (SP) and cactus silage with microbial inoculant (SPI) and five replications.  $P < 0.05$ ), dry matter intake, organic matter, neutral detergent fiber, ethereal extract, non-fibrous carbohydrates and total digestible nutrients, higher digestibility coefficients of dry matter, organic matter, as well as total digestible nutrients, On the other hand, there was no effect ( $P > 0.05$ ) of the diets on the nitrogen balance, mic efficiency robiana, losses of urinary nitrogen, faecal and microbial efficiency. The use of forage palm silage promotes a reduction in the enterobacteria count, improving nutrient intake and digestibility.

**Keywords:** Cactaceous, Ensiling, *Lactobacillus plantarum*, Ruminant

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Um dos grandes desafios dos produtores é conciliar, quantidade e qualidade de alimentos para os animais, devido às características edafoclimáticas presentes no semiárido brasileiro. Dessa forma, em virtude da variabilidade e incertezas das chuvas, a produção de forragem acaba se tornando uma atividade que apresenta risco aos produtores rurais. Assim, faz-se necessário o cultivo de plantas persistentes a tais condições e/ou conservação de volumosos com o intuito de preservar o valor nutritivo da planta e com isso, garantir alimento fresco para os ruminantes, em períodos onde as plantas tem o seu crescimento comprometido.

Para se obter silagens com adequado perfil fermentativo, pode ser necessário a utilização de bactérias lácticas como inoculantes bacterianos. Esses microrganismos estão presentes nas plantas *in natura*, e sua função é inibir microrganismos indesejáveis. Deste modo, os inoculantes microbianos podem ser comprados na forma solúvel ou liofilizado, reduzindo assim sua viabilidade. Por outro lado, pode-se também isolar e selecionar estirpes do suco da própria planta como potencial inoculante. Assim, para se obter êxito com a utilização de inoculantes microbianos é necessário a compatibilidade entre os substratos presentes na forragem e o inoculante (homofermentativo ou heterofermentativo), garantindo rápida fermentação e controle de microrganismos deletérios (Burns et al., 2018).

Por outro lado, as informações sobre as bactérias lácticas epifíticas isoladas da planta e da silagem de palma forrageira e seus efeitos durante a fermentação da massa ensilada são escassos na literatura. Assim, se identificadas as estirpes é possível a seleção de bactérias desejáveis, com capacidade de promover um rápido declínio do pH ou controle de microrganismos na abertura do silo. Atualmente, tem-se aumentado os estudos avaliando a silagem de palma forrageira, devido ao seu elevado rendimento, teores de carboidratos solúveis e aceitabilidade pelos animais (Gusha et al., 2015; Lima et al., 2016; Souza et al., 2016; Macêdo et al., 2018). Por esse motivo, a palma forrageira foi escolhido para isolamento e identificação de estirpes de BAL.

Portanto, objetivou-se com o presente estudo isolar, selecionar e identificar bactérias ácido-lácticas (BAL) da planta e da silagem da palma forrageira e avaliar seus efeitos quando utilizadas como aditivos no mesmo tipo de silagem, bem como seus efeitos sobre o consumo, digestibilidade de nutrientes, balanço nitrogenado, síntese de proteína microbiana e contagem de enterobactéria fecal em ovinos.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 A cultura da palma forrageira**

A palma forrageira pertence à família das Cactaceae, compreendendo aproximadamente 130 gêneros e 2.000 espécies. Dentre estes gêneros, os mais importantes são *Opuntia* e *Nopalea*, devido ao fato de serem utilizados como suplementos alimentares, produtos farmacêuticos, cosméticos e forragem para ruminantes. É uma planta originária de regiões de clima tropical, provavelmente do continente americano (México) (Shedbalkar et al., 2010; Reyes-Aguero e Rivera, 2011; Yahia e Sáenz, 2011; Beccaro et al., 2014).

Esta espécie forrageira apresenta metabolismo fotossintético CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas) bastante cultivada como forragem, e também utilizada com o objetivo de proteger e conservar os solos da erosão e desertificação, os quais diminuem a camada fértil da área, resultando em diminuição da produtividade das culturas (Bariagabre et al., 2016; Bautista-Cruz et al., 2017).

Dentre as vantagens da utilização dessa cactácea, é possível destacar o elevado potencial para produção de biomassa e a possibilidade de aproveitamento da rebrota dessa cultura (Lopes et al., 2018). Além disso, pode produzir em ambientes estressantes (moderadamente salinos e com déficit hídrico) para a maioria das plantas. Isso ocorre devido a eficiência de utilização da água, sendo uma importante fonte de alimento para os animais de regiões que apresentam tais condições (Shedbalkar et al., 2010; Nadaf et al., 2018).

Ranjan et al. (2016) descreveram que a palma forrageira é uma planta que apresenta raízes finas e superficiais (15 cm) e elevada renovação do sistema radicular, em situações prolongadas de escassez de água no solo. Assim, pode absorver eficientemente a água das chuvas e até mesmo orvalho, demonstrando a sua importância para regiões áridas e semiáridas.

Deste modo, a palma forrageira pode ser cultivada em diversas partes do mundo. Quando utilizada na alimentação dos animais, supre parte da exigência de forragem, promovendo melhoria no aproveitamento dos nutrientes pelos microrganismos ruminais (Lima et al., 2016).

Regiões que apresentam escassez de recursos hídricos representam em torno de 40% do globo terrestre e habitam cerca de 2 bilhões de habitantes. Nessas regiões há um elevado custo na produção de volumosos, sendo necessário o cultivo de plantas persistentes a tais condições, como a palma forrageira. Em condições de sequeiro como encontradas no Semiárido Brasileiro, a palma forrageira pode produzir em torno de 20 a 30t de MS/ha/ano, podendo aumentar os seus rendimentos utilizando adubação orgânica e irrigação por gotejamento (2,5 mm/semana) (Dubeux Jr. et al., 2015). De acordo com os mesmos autores, em condições adversas de clima, o cultivo da palma forrageira pode produzir em torno de 20 vezes mais NDT (nutrientes digestíveis totais) por unidade de área, se comparado com o

milho. Cactáceas do gênero *Opuntia* apresentam elevados teores de NDT (650-700 g/kg), podendo produzir até 60 vezes mais massa de forragem do que plantas nativas do Semiárido.

Segundo Souza et al. (2017), estudando a produtividade da palma miúda, observaram que a intensidade de cortes maximiza a produção dessa cactácea. Os mesmos autores constataram produtividade variando de 7,2 e 16,8 t MS ha<sup>-1</sup>, com densidades de plantio 5.000 e 40.000 plantas ha<sup>-1</sup> respectivamente, utilizando adubação química.

Na alimentação dos ruminantes, segundo, Aguilar-Yáñez et al. (2011) e Rodrigues et al. (2016), a palma forrageira pode suprir parcialmente a necessidade de utilização dos concentrados energéticos, além de garantir alimento para os animais em períodos de deficiência hídrica.

Além disso, Cordova-Torres et al. (2017), estudando a substituição (0; 30; 50 e 70%) de feno de capim tifton por palma forrageira na alimentação de ovinos, observaram, redução no consumo voluntário de água, com a inclusão desta cactácea (1,80; 0,48; 0,32; 0,22 kg), sem comprometer o desempenho animal. Por outro lado, ocorreu elevação no consumo de água total (2,07; 2,82; 3,19; 3,29 kg), isso ocorreu devido a elevada umidade (> 86%) dessa cactácea, que disponibilizou água via alimento. Segundo os autores, o consumo de matéria seca influencia a ingestão de água pelos animais. Assim, animais alimentados com palma forrageira exigem menor quantidade de água para suprir suas exigências.

## **2.2 Silagem de palma forrageira**

A conservação de volumosos na forma de silagem, de acordo com Silva et al. (2014) e Campos et al. (2017), tem como principal objetivo manter parcialmente a água e os nutrientes contidos na planta *in natura* com intuito de reduzir as deficiências ocorridas no período de seca, proporcionando alimento em quantidade e qualidade, além de reduzir os custos de produção das propriedades.

De acordo com McAllister et al. (2018), a prática de ensilar volumosos antecede o século XVIII. A técnica consiste primeiramente de uma fase aeróbia, onde existe uma diversidade microbiana (bactérias lácticas, enterobactérias, leveduras e fungos) competindo por substratos. Por outro lado, em condições de anaerobiose, esses microrganismos são reduzidos, ocorrendo predominância de bactérias ácido lácticas, o qual reduz o pH da massa ensilada. Segundo os mesmos autores, esses microrganismos não crescem igualmente nas diversas camadas da silagem, podendo apresentar elevação na população microbiana, devido o acúmulo de carboidratos solúveis.

Essa rápida queda do pH ocorre devido a constante de dissociação do ácido láctico (3,86), sendo considerado o ácido orgânico mais forte presente em silagens. Em virtude dessa característica, esse ácido é um índice da qualidade da silagem. O pH ideal da silagem varia de acordo com o material ensilado. Silagens de milho e gramíneas devem apresentar um pH variando de 3,5 a 4,5 e leguminosas 4,0 a 5,0, favorecendo a fermentação láctica (Goeser et al., 2015; Kung et al., 2018).

Embora os valores de pH sejam um indicativo de acidez, pode ser influenciado pela capacidade tamponante da cultura. Como relatado por Kung e Shaver (2001), esta variável isoladamente não define a qualidade do material ensilado. Segundo os mesmos autores, silagens que apresentam pH elevado ( $>4,6$ ), resultam em uma fermentação restrita, sendo influenciado pelos teores de matéria seca e proteína bruta. Por outro lado, silagens úmidas ( $<25\%$  MS) sua fermentação é prolongada, devido, elevada capacidade tamponante, proporcionando elevação nas concentrações de ácido acético ( $>3$  a  $4\%$  MS).

A conservação de palma forrageira na forma de silagem pode garantir aos agropecuaristas uma alternativa de conservar água e energia, agregando mais valor a esta cactácea nas regiões áridas e semiáridas. Isso porque permite o fornecimento de alimento durante período em que as demais plantas forrageiras tem o seu crescimento comprometido pelas condições climáticas. Com isso, esta silagem atende parcialmente a exigência de matéria seca e nutrientes dos animais (Silva et al., 2017).

Além disso, a ensilagem da palma forrageira permite a colheita de todo o palmal, uniformizando e aumentando a emissão de novos cladódios, resultando em elevação da produtividade da matéria seca desta cultura. A preservação de cladódios secundários resulta em aumento na matéria verde ( $227,67 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ ) e matéria seca ( $23,04 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ ), se comparado com os cladódios primários ( $173,11 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  de matéria verde e  $17,75 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  de matéria seca) (Lima et al., 2015). Este fato se deve ao favorecimento da área fotossintética e aumento no número de pontos para rebrota (Rego et al., 2014).

Além disso, o processamento dos cladódios liberam a mucilagem, mistura complexa de polissacarídeos constituída por arabinose, galactose, ramnose, e ácidos galacturônicos, que apresentam propriedades osmóticas de absorver os fluidos presentes no material ensilado, reduzindo as perdas por escoamento do efluente (Saenz, 2000; Matsuihiro et al., 2006; Sepúlveda et al., 2007; Felkai-Haddache et al., 2016).

Segundo Ventura-Aguilar et al. (2017), a mucilagem representa cerca de 14% do peso seco do cladódio, contendo aproximadamente 30% de água presente no parênquima de reserva. Entretanto, as condições de armazenamento influenciam o conteúdo da mucilagem,



uma vez que alterações na temperatura provocam a secreção lenta protegendo e retardando os danos causados nos tecidos vegetais.

Assim, quando a palma forrageira é conservada em anaerobiose, ocorre a produção de ácidos orgânicos (ácidos láctico e acético), que tem a função de reduzir o pH da massa ensilada, inibindo microrganismos indesejáveis. Essa capacidade de redução do pH é influenciada pelas quantidades de carboidratos solúveis em água e teores de matéria seca do vegetal. As concentrações de matéria seca e proteína bruta são praticamente inalterados em silagens que apresentam adequado perfil fermentativo. Por outro lado, os teores de carboidratos solúveis são parcialmente utilizados durante a fermentação da massa ensilada (Oliveira et al., 2013; Silva et al., 2017).

Outro aspecto que deve ser levado em consideração para ensilagem desta cactácea, refere-se aos teores de carboidratos solúveis em água. A palma forrageira apresenta elevados concentrações de pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (manose, glicose e galactose) (Habibi et al., 2004). As bactérias do ácido láctico (BAL) utilizam esses açúcares como substrato para produzir ácido láctico, resultando em silagens com adequado perfil fermentativo (Carvalho et al., 2014).

Analizando a composição bromatológica da palma, pressupõe-se uma susceptibilidade à ocorrência de fermentação alcoólica e atuação de microrganismos do gênero *Clostridium*, em função dos elevados teores de carboidratos solúveis e baixa concentração de matéria seca. Entretanto, esta cactácea apresenta substâncias tamponantes (ácidos oxálico, málico, cítrico, malônico, succínico e tartáricos) que podem inibir a ação de microrganismos deterioradores, por meio do tamponamento da massa ensilada, direcionando a fermentação para a produção de bactérias lácticas heterofermentativas. Desse modo, é necessário mais de 8% de carboidratos solúveis para elevar as concentrações de ácido láctico e minimizar as perdas fermentativas durante o processo de ensilagem da palma forrageira (Mcitekah, 2008; Abidi et al., 2009; Petera et al., 2015; Isaac. 2016; Carvalho et al., 2018).

Nogueira (2015) avaliando a ensilagem de palma forrageira aditivada com farelo de trigo e/ou ureia, observaram valores de pH oscilando entre 3,8 e 4,2, dentro da faixa considerada ideal para produção de ácido láctico, os quais são considerados níveis adequados para inibir fermentações secundárias (Salvo et al., 2013).

Çürek e Özen (2004) e Brito et al. (2017) encontraram resultados similares ao presente estudo ao pesquisarem o perfil fermentativo da silagem de palma forrageira. Os autores constataram pH médio em torno de 4,0, o que indica silagem com adequado perfil fermentativo. Macêdo et al. (2018) avaliando silagens de rações à base de palma forrageira,

observaram que as silagens foram bem fermentadas, porém, com o pH se estabilizando somente após os 14 dias de ensilagem, o que favoreceu uma produção razoável de ácido acético e manteve as silagens estáveis por mais de 48 horas após exposição ao oxigênio.

Esses baixos valores do pH da silagem de palma forrageira são um indicio da adequada conversão de carboidratos solúveis em ácido láctico (Chekir et al., 2013; Gusha et al., 2013; Gusha et al., 2015). Mokoboki et al. (2016) estudando a fermentação e o valor nutritivo da silagem de palma forrageira, constataram que 46,5 g/kg de MS dos ácidos orgânicos produzidos era ácido láctico, resultando em silagens com  $\text{pH} < 4,0$ .

### 2.3 Inoculantes bacterianos como aditivos na silagem

Os aditivos são substâncias adicionadas no momento da ensilagem que tem como objetivo estimular a fermentação láctica, inibir fermentações por microrganismos indesejáveis, reter umidade do material e/ou melhorar o seu valor nutritivo (Lala et al., 2010; Yitbarek e Tamir, 2014).

Os inoculantes microbianos podem ser classificados como bactérias lácticas homofermentativas, heterofermentativas ou a associação de ambas. Sua principal função é melhorar a fermentação da massa ensilada e/ou estabilidade aeróbia das silagens, inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis, com consequente diminuição das perdas dos nutrientes da silagem, refletindo no desempenho animal (Carvalho et al., 2014; Joo et al., 2018). Estes aditivos apresentam-se como ecologicamente corretos, de fácil aplicação e, portanto, são os mais utilizados no processo de ensilagem (Oliveira et al., 2013; Schreiter et al., 2014).

As BAL dividem-se em sete gêneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Weissella* (Pahlow et al., 2002). Dentre estes, o *Lactobacillus* é o gênero predominante em culturas forrageiras e silagens (Koc et al., 2017). As BAL são classificadas em três grupos: **Grupo I.** Bactérias lácticas homofermentativas (Embden–Meyerhof–Parnas (glicolítica)), utilizam hexoses no seu metabolismo, tendo como reação final a produção do ácido láctico; **Grupo II.** Bactérias lácticas heterofermentativas facultativas, podendo utilizar as vias homofermentativas e heterofermentativas, e utilizam hexoses e pentoses. **Grupo III.** Bactérias lácticas heterofermentativas obrigatórias (6-fosfogluconato/fosfoquetolase) fermentam pentoses, a produtos como: ácido láctico, dióxido de carbono, metanol ou ácido acético (Santos et al., 2013; Eikmeyer et al., 2015).

Nesse sentido, a utilização de inoculantes podem conter cepas de BAL homofermentativas, como *Enterococcus faecium* ou *Pediococcus acidilactici*, e BAL

heterofermentativas facultativas, como os *Lactobacillus plantarum*. Espera-se que, a utilização desses aditivos promovam rápida e eficiente conversão de carboidratos solúveis em lactato, promovendo um rápido declínio do pH da massa ensilada, o qual é capaz de controlar o crescimento de microrganismos intolerantes a acidez, que reduzem as perdas fermentativas, bem como elevam a recuperação de matéria seca (Baah et al., 2011; Li et al., 2019; Yan et al., 2019). No entanto, esses inoculantes homoláticos não promovem melhoria na estabilidade aeróbia da silagem, uma vez que não produzem ácido acético suficiente para inibir o crescimento das leveduras (Liu et al., 2019), os quais são os microrganismos iniciadores do processo de deterioração da massa ensilada após a abertura dos silos.

Assim, os inoculantes obtidos de cepas heterofermentativas obrigatórias tais como *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus buchneri*, convertem carboidratos solúveis e ácido láctico em ácido acético, etanol e dióxido de carbono (Borreani et al., 2018), implicando em maiores concentrações de acetato se comparado com BAL homofermentativas. Esse ácido apresenta função antifúngica, por isso, inibe o crescimento de leveduras e fungos filamentosos, consequentemente, a estabilidade aeróbia da silagem é aumentada (Carvalho et al., 2013; Li et al., 2015).

Recentemente, tem se utilizado suco fermentado da própria planta como inoculante microbiano. Esse tipo de aditivo é de fácil preparo e econômico se comparado aos aditivos comerciais, além de poder melhorar o perfil fermentativo da silagem, aumentando o consumo e digestibilidade dos nutrientes (Yanti et al., 2019).

Resultados contrários foram encontrados por Bureenok et al. (2011), onde observaram que as bactérias lácticas epifíticas presentes em gramíneas tropicais (*Brachiaria ruziziensis*) são predominantemente heterofermentativas, apresentando baixa diversidade de espécies. Assim, o inoculante produzido a partir destas plantas teve inadequada eficácia, devido a população de BAL e os teores de carboidratos solúveis presentes na planta serem insuficientes para garantir fermentação láctica.

Segundo Oliveira et al. (2011), o êxito na utilização dos inoculantes depende da capacidade desses microrganismos em competir e dominar a fermentação do material ensilado. Embora esses aditivos apresentem vantagens de utilização, nem sempre melhoram o perfil fermentativo da silagem. Isto pode ocorrer devido à elevada diversidade de BAL presentes na planta, tornando difícil o inoculante se sobressair aos microrganismos presentes na forragem.

Para garantir viabilidade do inoculante é necessário aplicar quantidades adequadas, uniformemente em toda a massa, observar a temperatura da mistura do inoculante em água,

não exceder 35 °C e armazenar o produto segundo recomendações do fabricante (Windle e Kung, 2016).

Assim, diversos fatores estão relacionados com as vantagens na aplicação de um inoculante, desde a utilização de fertilizantes orgânicos, época de colheita do material, população de microrganismos presente na planta e o tempo de fechamento do silo (Weiss et al., 2016).

#### **2.4 Perfil fermentativo, estabilidade aeróbia e valor nutritivo**

Logo após a compactação da forragem no silo, ocorre o consumo do oxigênio remanescente por enzimas da planta e/ou microrganismos aeróbios, tornando o ambiente em condições de anaerobiose. Assim, inicia a fermentação, onde as BAL, utilizam carboidratos solúveis no seu metabolismo, resultando na produção dos ácidos orgânicos, dentre esses merece destaque o ácido láctico, devido, auxiliar na redução do pH, quanto mais rápido ocorre essa redução menores serão as perdas por gases e efluentes (Mohd -Setapar et al., 2012).

Assim, o processo de ensilagem compreende basicamente quatro fases: aeróbia, fermentação ativa, estável e deterioração aeróbia. Esta última fase, está relacionada com o momento em que o silo é aberto para fornecer silagem aos animais, ou quando o oxigênio entra no silo devido o inadequado local de armazenamento. Deste modo, a exposição ao oxigênio pode favorecer a proliferação de microrganismos deterioradores como fungos filamentosos e leveduras, acarretando perda de nutrientes da silagem (Sá Neto et al., 2013).

Durante a fermentação da massa ensilada ocorre a competição por substratos (carboidratos solúveis e lactato) no interior do silo, ocasionando perdas de matéria seca e energia. Entretanto, a quantidade dessas perdas depende do microrganismo dominante da fermentação e substrato utilizado. Assim, é fundamental a utilização de aditivos que promovam a fermentação láctica e, conseqüentemente, diminuam perdas na ensilagem (Borreani et al., 2018).

As BAL utilizam duas rotas metabólicas (homoláticas e heteroláticas), ambas, podem ocorrer simultaneamente durante a ensilagem. A primeira rota metabólica é a homofermentativa, como produto final tem-se o lactato, responsável por conservar os teores de matéria seca e energia da silagem, resultando em elevada recuperação de matéria seca. Entretanto, essas silagens são propensas a deterioração na abertura do silo. Isso ocorre devido a conversão dos carboidratos solúveis em ácido láctico, acidificando rapidamente a massa ensilada, o que resulta em elevação na quantidade de carboidratos solúveis residuais, os quais podem servir de substrato para a crescimento de leveduras. Por outro lado, o rápido declínio

do pH inibe o aparecimento de clostrídeos, reduzindo consequentemente a produção dos ácidos orgânicos (acético e propiônico), os quais produzem substâncias que inibem o aparecimento de microrganismos indesejáveis e/ou patogênicos (Pahlow et al., 2002; Pan et al., 2019).

Assim, a utilização de BAL heterofermentativas, devido, converter ácido láctico em ácido acético em condições de anaerobiose e pH baixo, acarretando em redução na recuperação de matéria seca. Por outro lado, o ácido acético controla o aparecimento de fungos filamentosos (mofos) e unicelulares (leveduras) aumentando a estabilidade aeróbia da silagem (Carvalho et al., 2013; Li et al., 2015; Borreani et al., 2018).

As leveduras (aeróbias facultativas), utilizam carboidratos solúveis e posteriormente ácidos orgânicos no seu metabolismo, causando aumento da temperatura e pH. Tais alterações, proporcionam condições ideais para o crescimento de outros microrganismos deterioradores da silagem. Deste modo, contagens de levedura acima de  $10^6$  UFC/grama de massa fresca pode representar perdas de até 40% de matéria seca, diminuindo a qualidade da silagem (Borreani et al., 2018; Stoškus et al., 2018).

Para se determinar a estabilidade aeróbia de silagens podem ser utilizados dois critérios: Com base na temperatura (estável antes de elevar  $2^{\circ}\text{C}$ ) (Weiss et al., 2016; Romero et al., 2018) ou no pH das silagens (elevação de 0,5 do valor inicial) (Yuan et al., 2016; Ozduven et al., 2017). Essa elevação no pH ocasiona redução na concentração do ácido láctico na silagem (Jin et al., 2015).

A deterioração (perda energética) é resultado da ação de microrganismos deletérios, que influenciam negativamente o valor nutritivo do alimento (Jungbluth et al., 2017). Assim, os inoculantes heterofermentativos inibem o crescimento de microrganismos relacionados a estabilidade aeróbia, como as leveduras, principais responsáveis por iniciar a deterioração aeróbia da silagem (Sá Neto et al., 2013).

Esses microrganismos ocasionam elevadas perdas por gases, contribuindo para redução na recuperação de matéria seca e valor nutritivo da silagem (Weiss et al., 2016). Fato constatado por Moraes et al. (2017), avaliando silagens de cana de açúcar com diferentes inoculantes microbianos ((SC; Controle); SC + *Lactobacillus buchneri* (LB); SC + *Propionibacterium acidipropionici* (PA); SC + *P. acidipropionici* + *Lactobacillus plantarum* (PALP); SC + *L. buchneri* + *P. acidipropionici* (LBPA); SC + *L. buchneri* + *P. acidipropionici* + *L. plantarum* (LBPALP)), observaram que as maiores perdas fermentativas da silagem de cana de açúcar são na forma de gases. Assim, as silagens inoculadas com o *L. Plantarum* apresentaram as maiores perdas de matéria seca.

Gomes et al. (2019) avaliando a silagem de aveia branca (*Avena sativa* cv. URS Charrua), observaram que silagens que apresentam acima de 30% de matéria seca são mais propensas a instabilidade aeróbia. Os autores observaram que a utilização do inoculante *Lactobacillus buchneri* aumentou a concentração de ácido acético (15,1- 69,7 g/kg MS) e a estabilidade aeróbia (184- 240 hs), entretanto, reduziu os teores de ácido láctico (40,5- 18,5 g/kg MS), para a silagem controle e com inoculante, respectivamente.

Assim, de acordo com Da Silva et al. (2019), as maiores concentrações de ácido acético são observados em silagens aditivadas com *Lactobacillus buchneri*, após 45 dias de fermentação da massa ensilada. Silagens aditivadas com esse inoculante apresentam elevados teores de ácido acético variando de 3 a 5% MS, quantidades ideais para inibir a proliferação de leveduras e fungos (Nkosi e Meeske, 2010). Contudo, silagens não tratadas apresentam níveis normais de ácido acético (1 a 3% MS) (Kung et al., 2018).

Suas concentrações são inversamente proporcionais aos teores de umidade do material ensilado. Silagens com elevados teores de ácido acético apresentam odor suave de vinagre e cor amarelada, resultantes do metabolismo das bactérias heterofermentativas e também de diversas bactérias (Kung et al., 2018).

Assim, a deterioração aeróbia da silagem eleva as perdas de matéria seca e reduz o valor nutritivo, podendo promover contaminação por micotoxinas, as quais influenciam negativamente a aceitabilidade do alimento pelo ruminante, acarretando diminuição na produção de carne ou leite, além de representar risco para a saúde dos animais (Dogi et al., 2015).

Segundo Ferrero et al. (2019), as aflatoxinas podem estar presentes na planta do milho e sobreviver a condições de anaeróbiose, por outro lado, em contato com o oxigênio provocam elevação no pH (>5) e temperatura (35 °C) na silagem, ocasionando redução no consumo e desempenho produtivo dos animais. Assim, esses microrganismos deletérios estão relacionados a qualidade da silagem.

Segundo Nkosi e Meeske (2010), silagens mal fermentadas podem prejudicar a saúde dos ruminantes e sua produção. Isso ocorre, devido, a presença de microrganismos como os clostrídios, os quais se desenvolvem em silagens com inadequados teores de matéria seca (<250g/kg) e pH elevado (>5,0). Esses microrganismos produzem substâncias tóxicas (aminas biogênicas) e promovem proteólise. Com isso, reduz o valor nutritivo e a aceitabilidade da silagem, depreciando o consumo da matéria seca pelos ruminantes (Driehuis et al., 2018). Assim, faz-se necessário elevadas concentrações de ácido láctico para atingir um pH crítico para o crescimento dos clostrídeos.

Silagens com pH elevado pode favorecer a proliferação de diversos microrganismos como: *Bacillus cereus* (microrganismo presente no solo), os quais participam da deterioração aeróbia da silagem, formando dióxido de carbono e amônia (Driehuis et al., 2018). Contudo, silagens bem fermentadas não apresentam risco a saúde dos ruminantes (Durmaz et al., 2015).

Inoculantes heterofermentativos (*Lactobacillus buchneri*) produzem a enzima ferulato esterase, que quebra as ligações entre a lignina e a hemicelulose, disponibilizando substratos para a fermentação e reduzindo a concentração de fibra da silagem, podendo elevar o consumo e o aproveitamento dos nutrientes (Lara et al., 2016). Entretanto, esses microrganismos podem reduzir a qualidade da fermentação da massa ensilada, devido, elevação na concentração de amônia, etanol e redução nos teores de proteína da silagem (Jin et al., 2015).

Assim, silagens aditivadas com inoculantes heteroláticos promovem diminuição na relação ácido láctico:acético, ocasionando redução nas concentrações energéticas da silagem. Por outro lado, o ácido láctico resultante da fermentação é convertido em propionato no rúmen, resultando em disponibilidade de energia para os microrganismos ruminais (Grant e Ferraretto, 2018).

Entretanto, de forma geral o consumo das silagens, é inferior a ingestão de forragem *in natura*, isso porque elevadas concentrações dos ácido orgânicos produzidos durante a fermentação da silagem, promove decréscimo na disponibilidade de energia, devido a redução dos teores de carboidratos solúveis, causando assim uma restrição na aceitabilidade da silagem (Rabelo et al., 2018).

Segundo Weinberg et al. (2003), existem duas hipóteses para tentar explicar a melhoria no desempenho dos animais alimentados com silagem inoculada. A primeira refere-se a possibilidade da associação de algumas espécies de bactérias lácticas aos microrganismos ruminais, com isso, melhora a saúde ruminal, devido a produção de bacteriocinas. A segunda hipótese é que o adequado perfil fermentativo da silagem inoculada promova melhoria no desempenho animal.

## **2.5 Impacto da silagem no consumo e digestibilidade dos nutrientes**

O consumo é a variável mais importante para determinar a qualidade da silagem. Sendo influenciado por diversos fatores como: produtos finais da fermentação, teor energético e deterioração aeróbia da silagem. Por outro lado, silagens com adequado perfil fermentativo pode favorecer o consumo, digestibilidade, eficiência e resultar na produção de carne e/ou leite mais saudáveis (Claffey et al., 2018).

No entanto, animais alimentados com silagens mal fermentadas, apresentam redução na aceitabilidade, devido a presença de inadequados teores de aminoácidos, energia e elevadas concentrações de ácidos a serem metabolizados. Entretanto, esses efeitos negativos dependem da associação de diversos fatores como: pH (influenciado pelas concentrações de amônia, ácido acético e substâncias tamponantes), acidez (reduz taxa de passagem e o aproveitamento da fração fibrosa da silagem) e perdas por efluentes. Deste modo, o sabor, cheiro e textura, influenciam o consumo e a digestibilidade da silagem (Dulphy e Van Os, 1996).

Segundo os mesmos autores, silagens com adequado perfil fermentativo, tem pouco ou nenhum efeito no consumo se comparado com a forragem fresca ou desidratada. Por outro lado, Zailan et al. (2018) constataram diferenças nutritivas entre a silagem e a forragem *in natura*, do capim elefante. Observaram redução nas concentrações de fibra em detergente neutro (71,68 a 66,95%), fibra em detergente ácido (41,51 a 38,31%) e digestibilidade *in vitro* da matéria seca (68,75 a 60,38%) para o material fresco e ensilado, respectivamente. Segundo os autores, a silagem do capim elefante promove proteólise e lixiviação dos nutrientes na forma de efluentes, carreando nutrientes como os carboidratos solúveis, resultando em redução no consumo e digestibilidade dos nutrientes.

Resultados semelhantes foram encontrados por Santos e Kung (2016), onde atribuíram a redução nutritiva da silagem aos produtos finais da fermentação, como os ácidos orgânicos, nitrogênio amoniacal e aminas, influenciando diretamente o consumo da matéria seca.

Assim, silagens úmidas (>70%) que apresentam inadequados teores de matéria seca e carboidratos solúveis, tem o seu valor alimentar associado a presença de clostrídeos. Sendo assim, essa silagem acaba sendo proibida em algumas regiões da Europa, devido apresentar risco para a saúde dos ruminantes (Wilkinson e Rinne, 2018).

Udén (2017) estudando a composição das plantas forrageiras frescas e ensiladas, observou que a silagem apresenta redução nas concentrações de carboidratos solúveis em relação a planta fresca. Essa quantidade de carboidrato residual é resultante da extensão da fermentação, o qual depende da presença de oxigênio, capacidade tamponante da cultura e inibidores da fermentação. Assim, segundo o autor, dentre os fatores que influenciam o valor nutritivo das silagens são: perdas fermentativas; deterioração aeróbia; diminuição nos teores de carboidratos solúveis; proteólise; ácidos e álcoois.

De acordo com Gerlach et al. (2013), a temperatura da silagem influencia negativamente o consumo voluntário por caprinos. Os autores observaram que na silagem de milho exposta ao oxigênio por oito dias, ocorre degradação do ácido láctico, ácido acético e açúcares, os quais serviram de fontes energéticas para as leveduras. Por outro lado, promoveu



elevação nas concentrações dos ácidos propiônico, isobutírico, isovalérico e pH. Assim, esse período de exposição ao oxigênio promoveu redução no consumo de matéria seca em 53% em comparação a silagem fresca.

Resultados semelhantes foram encontrados Gerlach et al. (2014), estudando a exposição aeróbia de silagens de gramíneas e seu impacto sobre o consumo de matéria seca e preferência por caprinos, observaram que o consumo de matéria seca variou de 566 a 272 g/3 hs de fornecimento. Segundo os autores, essa redução na ingestão é devido elevação nos teores de nitrogênio amoniacal (122-134 g/kg do N total), e bactérias aeróbias mesófilas ( $4,0-4,6 \log 10$  ufc/g) para as silagens na abertura, e após oito horas de exposição aeróbia, respectivamente. Assim, ocorreu degradação da proteína e aminoácidos, produzindo compostos que prejudicaram o consumo e aproveitamento dos nutrientes pelos microrganismos ruminais.

Assim, faz-se necessário a utilização dos inoculantes microbianos, com intuito de reduzir as perdas fermentativas e elevar as concentrações de ácido láctico na silagem. Entretanto, esse ácido pode influenciar aceitabilidade da silagem e os ácidos graxos de cadeia curta no rúmen (Rabelo et al., 2017).

Daniel et al. (2018) avaliando o desempenho de vacas em lactação, alimentadas com silagem aditivada com inoculante bacteriano homolático, não observaram diferença para o consumo de matéria seca. Apesar disso, as dietas influenciaram positivamente a digestibilidade da matéria seca (68,8 a 70,8%) para a silagem controle e aditivada, respectivamente. Segundo os mesmos autores, a utilização do inoculante microbiano, provavelmente, melhora a digestibilidade do alimento devido as propriedades benéficas do ácido láctico na silagem. Entretanto, ainda não se sabe a ação do inoculante microbiano no rúmen, sendo necessários mais estudos avaliando o desempenho animal.

De acordo com Weinberg et al. (2007), a utilização dos inoculante microbianos, melhora o consumo e a digestibilidade dos nutrientes, provavelmente devido as BAL promoverem um efeito probiótico no ambiente ruminal. Além disso, estas estirpes apresentam atividade antibacteriana, inibindo microrganismos indesejáveis e/ou patógenos na silagem, no rúmen ou em ambos.

## **2.6 Inoculantes como probióticos para ruminantes**

Os probióticos são microrganismos vivos que tem como finalidade restabelecer ou melhorar a saúde intestinal dos animais, devido inibição de patógenos (Han et al., 2012).

Segundo Ma et al. (2018), recentemente, percebeu-se a necessidade de substituir antibióticos por probióticos na criação de ruminantes.

Estes antibióticos podem ficar acumulados no corpo do animal, podendo ser nocivo para o consumo humano. Por isso, os consumidores estão cada vez mais preocupados com a segurança e a qualidade dos produtos animais. Diante disso, procura-se reduzir a utilização de antibióticos por aditivos como os probióticos, visando melhorar a eficiência alimentar, produção de carne ou leite e garantir equilíbrio ao ecossistema ruminal, devido, os probióticos agirem em conjunto com os microrganismos ruminais (Vohra et al., 2016).

Assim, pode ser benéfico para saúde e também estimular o crescimento dos ruminantes, pelo fato desses microrganismos se aderirem e colonizarem as células do epitélio ruminal, promovendo melhoria na absorção dos nutrientes, resultando em elevação no desempenho animal (Adjei-Fremah et al., 2018).

Estirpes probióticas apresentam elevada ação profilática e mutualista. Entretanto, sua eficácia depende de diversos fatores como: idade, raça do animal, período e forma de suplementação, dosagem e estirpes utilizadas. São obtidos geralmente de bactérias Gram positivas, pertencentes aos gêneros: *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. Com destaque para os *Lactobacillus*, pois fazem parte da microbiota natural do trato gastrointestinal dos ruminantes (Ma et al., 2018).

Os inoculantes microbianos como o *Lactobacillus plantarum*, são utilizados como próbióticos na alimentação dos ruminantes. Entretanto, o seu modo de ação não é totalmente compreendido. Essas estirpes podem sobreviver as condições ruminais (temperatura, pH e ácidos graxos de cadeia curta) influenciando positivamente os processos digestivos e imunológicos, acarretando imunidade ao organismo dos animais, resultando em aumento no consumo, produção de leite e ganho de peso (Weinberg et al., 2003; Weinberg et al., 2016).

Entretanto, sabe-se que ocorre competição das estirpes probióticas com bactérias nativas ou patogênicas, por sítios de ligações competindo por substratos necessários para produzir substâncias antibacterianas. Com isso, estimula o sistema imunológico a inibir microrganismos como as enterobactérias, reduzindo a incidência de diarreia nos animais (Raabis et al., 2019).

Deste modo, recentemente tem-se priorizado a utilização dos *Lactobacillus plantarum* em vez de aditivos químicos no processo fermentativo (Srisesharam et al., 2018), devido produzir compostos antimicrobianos, tais como: ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil, bacteriocinas e também peptídeos antimicrobianos, os quais tem a função de proteger o hospedeiro contra patógenos de origem alimentar (Arena et al., 2016).

Assim, um dos principais problemas do confinamento de pequenos ruminantes é a ocorrência de diarreia, causada pela proliferação de microrganismos deletérios, que contaminam os alimentos e ficam retidos no trato gastrointestinal, prejudicando a absorção dos nutrientes, refletindo no desempenho animal (Ferhat et al., 2019). Isso acarreta em perdas econômicas, sendo necessário condições sanitárias adequadas e fornecer alimentos livre de patógenos.

Por outro lado, o fornecimento dos volumosos *in natura* pode favorecer a ocorrência de patógenos, provenientes do solo. Entretanto, silagens com adequado perfil fermentativo são livres de patógenos e toxinas, com isso, fornece nutrientes, além de garantir segurança e qualidade dos produtos de origem animal. Deste modo, os inoculantes microbianos podem apresentar efeitos positivos na fermentação e/ou após a abertura do silo. Além disso, algumas cepas tem a capacidade de inibir patógenos como as enterobactérias e clostrídeos, devido um rápido declínio do pH para valores próximos a 4,0. Assim, impedem a disseminação de microrganismos indesejáveis na fazenda (Queiroz et al., 2018).

Dentre os microrganismos indesejáveis, a *Escherichia coli* merece destaque por ser uma bactéria anaerobia facultativa, gram negativa e que habitam normalmente o trato gastrointestinais dos animais (Tenaillon et al., 2010). São classificadas em microrganismos típicos e atípicos. Os microrganismos típicos fazem parte da microbiota intestinal, não causando danos a saúde dos animais. Por outro lado, os atípicos apresentam genes de patogenicidade, resultante de uma lesão (attaching and effacing (A/E)), provocada pela aderência dessa bactéria no tecido epitelial. Assim, esses microrganismos são diferenciados pela presença ou ausência de fatores de virulência (Martins et al., 2016).

Segundo os mesmos autores, em estudo com ovinos (92 cordeiros e 38 animais adultos), constataram que apenas os cordeiros foram positivos para *Escherichia coli* enteropatogênica (zoonose). Essa bactéria produz a toxina shiga, tornando o organismo dos animais mais susceptíveis a infecções no trato urinário, podendo ocasionar também diarreia aguda e até a morte dos animais, desde que seu sistema imunológico esteja comprometido.

Essa toxina provoca elevada citotoxicidade (destruição de células liberando substâncias nocivas) e síndrome hemolítico urêmica (redução na quantidade de glóbulos vermelhos, insuficiência renal, diminuição nas plaquetas e diarreia sanguinolenta). Esse patógeno acomete principalmente ovinos, alimentados com dietas contaminados com enterobactérias. Além disso, pode acarretar doenças graves nos humanos (Martins et al. 2015).

Por outro lado, a inclusão de elevados teores (>50%) de palma forrageira na dieta animal causa um efeito laxativo, tornando as fezes úmidas ou causando diarreia não patogênica,

devido elevação de água que não foi metabolizado pelo organismo animal (Waal et al., 2006). Além disso, essa cactácea apresenta baixa efetividade da fibra, ocasionando redução na ruminação, o qual influencia no consumo matéria seca (Alves et al., 2003).

No entanto, apresenta elevados teores de carboidratos e umidade. Assim, quando essa planta é processada e exposta ao oxigênio por um período longo de tempo pode favorecer a proliferação de enterobactérias, as quais podem ser patogênicas, reduzindo consequentemente a produtividade dos ruminantes (Elghandour et al., 2018).

Assim, para reduzir as concentrações de carboidratos não fibrosos, doenças metabólicas e enterobactérias pode-se utilizar o processo de ensilagem (Mariz et al., 2013). Durante o processo fermentativo, as bactérias lácticas produzem bacteriocinas, as quais inibe a ação de microrganismos prejudiciais a silagem e também aos microrganismos ruminais (Weinberg et al., 2004; Ni et al., 2017).

Para diminuir a incidência de problema causada por microrganismos oportunistas é necessário cuidados com a higiene durante o processo de ensilagem, bem como a utilização de inoculantes que combatam microrganismos deterioradores (Durmaz et al., 2015; Zielinska et al., 2015).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adjei-Fremah, S.; Ekwemalor, K.; Worku, M.; Ibrahim, S. Probiotics and ruminant health. In: Probiotics—current knowledge and future prospects. IntechOpen, **Probiotics and Ruminant Health**, 2018.

Aguilar-Yáñez, M. I.; Hernández-Mendo, O.; Guerrero-Legarreta, I.; Ramírez-Bribiesca, J. E.; Aranda-Osorio G.; Crosby-Galvan, M. M. Productive response of lambs fed with fresh or dehydrated spineless cactus (*Opuntia ficus-indica* L.). **J. PACD** 13, 23–35, 2011.

Arena, M. P.; Silvain, A.; Normanno, G.; Grieco, F.; Drider, D.; Spano, G.; Fiocco, D. (2016). Use of *Lactobacillus plantarum* Strains as a Bio-Control Strategy against Food-Borne Pathogenic Microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, 7, 2016.

Abidi, S.; Ben Salem, H.; Martín-García, A. I.; Molina-Alcaide, E. Ruminal fermentation of spiny (*Opuntia amyclae*) and spineless (*Opuntia ficus indica* f. *inermis*) cactus cladodes and diets including cactus. **Animal Feed Science and Technology**, 149, 333–340, 2009.

Alves, K. S.; Carvalho, F. F. R.; Vêras, A. S. C.; Andrade, M. F.; Costa, R. G.; Batista, Â, M. V.; Medeiros, A. N.; Maior Junior, R. J. S.; Andrade, D. K. B. Níveis de Energia em Dietas para Ovinos Santa Inês: Desempenho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 32, 6, 1937-1944, 2003.

Brito, G. S. M. S.; Sá, W. C. C. S.; Oliveira, J. S.; Bezerra, H. F. C.; Santos, A. P. M.; Pereira, G. A.; Corrêa, Y. R.; Pereira, D. M. Perfil fermentativo da silagem de palma forrageira com aditivos químicos e microbianos. Congresso Nordestino de Produção Animal (CNPA). Petrolina-PE / Juazeiro-BA. **Anais...** Novembro de 2017.

Beccaro, G. L., Bonvegna, L., Donno, D., Mellano, M. G., Cerutti, A. K., Nieddu, G., I. Chessa, I., Bounous, G. *Opuntia* spp. biodiversity conservation and utilization on the Cape Verde Islands. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 62(1), 21–33, 2014.

Bautista-Cruz, A.; Leyva-Pablo, T.; De León-González, F.; Zornoza, R.; Martínez-Gallegos, V.; Fuentes-Ponce, M.; Rodríguez-Sánchez, L. Cultivation of *Opuntia ficus-indica* under different management practices: a possible sustainable agricultural system to promote soil carbon sequestration and increase soil microbial biomass and activity. **Land Degrad Dev**, 1–9, 2017.

Bariagabre, S. A.; Asante, I. K.; Gordon, C.; Ananng, T. Y. Cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.) a valuable crop for restoration of degraded soils in Northern Ethiopia. **Journal of Biology, Agriculture & Healthcare**, 6(8), 11–18, 2016.

Baah, J.; Addah, W.; Okine, E. K.; McAllister, T. A. Effects of Homolactic Bacterial Inoculant Alone or Combined with an Anionic Surfactant on Fermentation, Aerobic Stability and *In situ* Ruminant Degradability of Barley Silage. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, 24, 369-378, 2011.

Borreani, G.; Tabacco, E.; Schmidt, R. J.; Holmes, B. J.; Muck, R. E. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**, 101:3952–3979, 2018.

Bureenok, S.; Suksombat, W.; Kawamoto, Y. Effects of the fermented juice of epiphytic lactic acid bacteria (FJLB) and molasses on digestibility and rumen fermentation characteristics of ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) silages. **Livestock Science**, 138(1-3), 266–271, 2011.

Burns, P.; Borgo, M. F.; Binetti, A.; Puntillo, M.; Bergamini, C.; Páez, R.; Mazzoni, R.; Reinheimer, J.; Vinderola, G. Isolation, Characterization and Performance of Autochthonous Spray Dried Lactic Acid Bacteria in Maize Micro and Bucket-Silos. **Frontiers in Microbiology**, 2018.

Claffey, N. A.; Fahey, A. G.; Gkarane, V.; Moloney, A. P.; Monahan, F. J.; Diskin, M. G. Effect of Forage to Concentrate Ratio and duration of Feeding on Growth and Feed Conversion Efficiency of Male Lambs. **Translational Animal Science**, 2018.

Campos, F. S.; Carvalho, G. G. P.; Santos, E. M.; Araújo, G. G. L.; Gois, G. C.; Rebouças, R. A.; Leão, A. G.; Santos, S. A.; Oliveira, J. S.; Leite, L. C.; Araújo, M. L. G. M. L.; Cirne, L. G. A.; Silva, R. R.; Carvalho, B. M. A. Influence of diets with silage from forage plants adapted to the semi-arid conditions on lamb quality and sensory attributes. **Meat Science**, 124, 61-68, 2017.

Carvalho, C.B.M.; Edvan, R.L.; Carvalho, M.L.A.M.; Reis, A.L.A.; Nascimento, R.R. Uso de cactáceas na alimentação animal e seu armazenamento após colheita. **Archivos de Zootecnia**, 67 (259): 440-446. 2018

Carvalho, B. F.; Ávila, C. L. S.; Pinto, J. C.; Neri, J.; Schwan, R. F. Microbiological and chemical profile of sugar cane silage fermentation inoculated with wild strains of lactic acid bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, 195, 1-13. 2014.

Carvalho, B. F.; Ávila, C. L. S.; Pinto, J. C.; Schwan, R. F. Effect of propionic acid and *Lactobacillus plantarum* UFLA SIL 1 on the sugarcane silage with and without calcium oxide. **African Journal of Microbiology Research**, 7, 4159-4168, 2013.

Chekir, I.; Ayed, L.; Hamdi, M.; Salem, H. B. Lactic fermentation to improve the nutritive value of *Opuntia ficus-indica* f. *inermis* cladodes mixed with some agro-industrial by-products. **Acta Horticulturae**, 995: 319–324, 2013.

Çürek, M.; N. Özen. Feed value of cactus and cactus silage. **Turkey Journal Veterinary Animal Science**, 28, 633- 639, 2004.

Cordova-Torres, A. V.; Costa, R. G.; Medeiros, A. N. De.; Araújo Filho, J. T.; Ramos, A. O.; Alves, N. de L. Performance of sheep fed forage cactus with total water restriction. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 18, 2, 369-377, 2017.

Durmaz, H., Avci, M., Aygün, O. The Presence of Listeria Species in Corn Silage and Raw Milk Produced in Southeast Region of Turkey. **Kafkas Univ Vet Fak Derg.** 21, 41-44, 2015.

Daniel, J. L. P.; Queiroz, O. C. M.; Arriola, K. G.; Daetz, R.; Basso, F.; Romero, J. J.; Adesogan, A. T. Effects of homolactic bacterial inoculant on the performance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 101, 6, 2018.

Dulphy, J. P.; M. Van Os. Control of voluntary intake of precision-chopped silages by ruminants: A review. **Reproduction Nutrition Development**, 36:113–135, 1996.

Dogi, C. A.; Pellegrino, M.; Poloni, V.; Poloni, L.; Pereyra, C. M.; Sanabria, A.; Pianzzola, M. J.; Dalcero, A.; Cavaglieri, L. Efficacy of corn silage inoculants on the fermentation quality under farm conditions and their influence on *Aspergillus parasiticus*, *A. flavus* and *A. fumigatus* determined by q-PCR. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 32(2), 229–235, 2015.

Dubeux JR, J. C. B.; dos Santos, M. V. F.; de Mello, A. C. L.; da Cunha, M. V.; Ferreira, M. A.; dos Santos, D. C.; Lira, M. A.; Silva, M. C. Forage potential of cacti on drylands. **Acta Horticulturae (ISHS)**, Leuven, v. 1. n. 1067-24, p. 181-186, 2015.

Da silva, L. D.; Pereira, O. G.; Roseira, J. P.S.; Agarussi, M. C. N.; da Silva, V. P.; da Silva, T. C. Fermentative profile of maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Revista de Ciências Agrárias-Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Science**, 62, 2019.

Driehuis, F.; Wilkinson, J. M.; Jiang, Y.; Ogunade, I.; Adesogan, A. T. Silage review: Animal and human health risks from silage. **Journal of Dairy Science**, 101(5), 4093–4110, 2018.

Eikmeyer, F. G.; Heintz, S.; Marx, H.; Pühler, A.; Grabherr, R.; Schlüter, A. Identification of Oxygen-Responsive Transcripts in the Silage Inoculant *Lactobacillus buchneri* CD034 by RNA Sequencing. **Plos one**, 2015.

Elghandour, M. M. Y.; Khusro, A.; Salem, A. Z. M.; Mariezcurrena-Berasain, M. A.; Camacho Díaz, L. M.; Cipriano-Salazar, M. Role of dose dependent *Escherichia coli* as ruminal anti-microflora agent to mitigate biogases production in prickly pear cactus flour based diet. **Microbial Pathogenesis**, 115, 208–215, 2018.

Felkai-Haddache, L.; Dahmoune, F.; Remini, H.; Lefsih, K.; Mouni, L.; Madani, K. Microwave optimization of mucilage extraction from *Opuntia ficus indica* Cladodes. **International Journal of Biological Macromolecules**, 84, 24–30, 2016.

Ferrero, F.; Prencipe, S.; Spadaro, D.; Gullino, M. L.; Cavallarin, L.; Piano, S.; Tabacco, E.; Borreani, G. Increase in aflatoxins due to *Aspergillus section Flavi* multiplication during the aerobic deterioration of corn silage treated with different bacteria inocula. **Journal of Dairy Science**, 102, 2, 2019.

Ferhat, L.; Chahed, A.; Hamrouche, S.; Korichi-Ouar, M.; Hamdi, T.-M. Research and molecular characteristic of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from sheep carcasses. **Letters in Applied Microbiology**, 2019.

Grant, R. J.; Ferraretto, L. F. Silage review: Silage feeding management: Silage characteristics and dairy cow feeding behavior. **Journal of Dairy Science**, 101(5), 4111–4121, 2018.

Goeser, J. P.; Heuer, C. R.; Crump, P. M. Forage fermentation product measures are related to dry matter loss through meta-analysis. **The Professional Animal Scientist**, 31, 137–145, 2015.



Gerlach, K.; Roß, F.; Weiß, K.; Büscher, W.; Südekum, K. H. Changes in maize silage fermentation products during aerobic deterioration and effects on dry matter intake by goats. **Agricultural and food science**, 22: 168–181, 2013.

Gerlach, K.; Roß, F.; Weiß, K.; Büscher, W.; Südekum, K. H. Aerobic exposure of grass silages and its impact on dry matter intake and preference by goats. **Small Ruminant Research**, 117(2-3), 131–141, 2014.

Gomes, A. L. M.; Jacovaci, F. A.; Bolson, D. C.; Nussio, L. G.; Jobim, C. C.; Daniel, J. L. P. (2018). Effects of light wilting and heterolactic inoculant on the formation of volatile organic compounds, fermentative losses and aerobic stability of oat silage. **Animal Feed Science and Technology**, 247, 194-198, 2019.

Gusha, J.; Katsande, S.; Zvinorova, P. I.; Ncube, S. The nutritional composition and acceptability of cacti (*Opuntia ficus indica*)-legume mixed silage. **Online Journal of Animal and Feed Research**, 3, 2, 116-120, 2013.

Gusha, J.; Halimani, T. E.; Ngongoni, N. T.; Ncube, S. Effect of feeding cactus-legume silages on nitrogen retention, digestibility and microbial protein synthesis in goats. **Animal Feed Science and Technology**, 206, 1–7, 2015.

Habibi, Y.; Heyraud, A.; Mahrouz, M.; Vignon, M. Características estruturais de polissacarídeos pécnicos da pele de frutos de pêra espinhosa *Opuntia ficus-indica*. **Carbohydrate Research**, 339 (6), 1119–1127, 2004.

Han, H.; Takase, S.; Nishino, N. Survival of silage lactic acid bacteria in the goat gastrointestinal tract as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. **Letters in Applied Microbiology**, 55, 384–389, 2012.

Isaac, A. A. Overview of Cactus (*Opuntia Ficus-Indica* (L): A Myriad of Alternatives. **Studies on Ethno-Medicine**, 10: 195-205, 2016.

Jungbluth, K. H.; Trimborn, M.; Maack, G. C.; Büscher, W.; Li, M.; Cheng, H.; Cheng, Q.; Sun, Y. Effects of Three Different Additives and Two Different Bulk Densities on Maize

Silage Characteristics, Temperature Profiles, CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>–Dynamics in Small Scale Silos during Aerobic Exposure. **Applied Sciences**, 7(6), 545, 2017.

Joo, Y. H.; Kim, D. H.; Paradhipta, D. H. V.; Lee, H. J.; Amanullah, S. M.; Kim, S. B.; Chang, J. S.; Kim, S. C. Effect of microbial inoculants on fermentation quality and aerobic stability of sweet potato vine silage. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 31, 12:1897-1902, 2018.

Jin, L.; Duniere, L.; Lynch, J. P.; McAllister, T. A.; Baah, J.; Wang, Y. Impact of ferulic acid esterase producing lactobacilli and fibrolytic enzymes on conservation characteristics, aerobic stability and fiber degradability of barley silage. **Animal Feed Science and Technology**, 207, 62–74, 2015.

Kung, L.; Shaver, R. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. **Focus on Forage**, 3, 1-5, 2001.

Kung, L.; Shaver, R. D.; Grant, R. J.; Schmidt, R. J. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of Dairy Science**, 101(5), 4020–4033, 2018.

Koc, F.; Aksoy, S. O.; Okur, A. A.; Celikyurt, G.; Korucu, D.; Ozduven, M. L. Effect of pre-fermented juice, lactobacillus plantarum and lactobacillus buchneri on the fermentation characteristics and aerobic stability of high dry matter alfalfa bale silage. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, 27(6), 1766-1773, 2017.

Lara, E. C.; Basso, F. C.; de Assis, F. B.; Souza, F. A.; Berchielli, T. T.; Reis, R. A. Changes in the nutritive value and aerobic stability of corn silages inoculated with *Bacillus subtilis* alone or combined with *Lactobacillus plantarum*. **Animal Production Science**, 56(11), 1867, 2016.

Lopes, M. N.; Cândido, M. J. D.; Gomes, E. C.; Pompeu, R. C. F. F.; da Silva, R. G. Biomass flow and water efficiency of cactus pear under different managements in the Brazilian Semiarid. **Revista Ciência Agronômica**, 49, 2, 324-333, 2018.

Lima, G. F. C.; Rêgo, M. M. T.; Aguiar, E. M.; Silva, J. G. M.; Dantas, F. D. G.; Guedes, F. X.; Lôbo, R. N. B. Effect of different cutting intensities on morphological characteristics and productivity of irrigated nopalea forage cactus. **Acta Horticulturae**, (1067), 253–258, 2015.

Lima, G. F. da C.; Rego, M. M. T.; Dantas, F. D. G.; Lôbo, R. N. B.; da Silva, J. G. M.; de Aguiar, E. M. Morphological characteristics and forage productivity of irrigated cactus pear under different cutting intensities. **Revista Caatinga**, 29, 2, 481-488, 2016.

Li, P.; Zhang, Y.; Gou, W.; Cheng, Q.; Bai, S.; Cai, Y. Silage fermentation and bacterial community of bur clover, annual ryegrass and their mixtures prepared with microbial inoculant and chemical additive. **Animal Feed Science and Technology**, 247, 285-293, 2019.

Li, D.; Ni, K.; Pang, H.; Wang, Y.; Cai, Y.; Jin, Q. Identification and Antimicrobial Activity Detection of Lactic Acid Bacteria Isolated from Corn Stover Silage. **Asian Australas. Journal of Animal Science**, 28, 620-63, 2015.

Liu, B.; Huan, H.; Gu, H.; Xu, N.; Shen, Q.; Ding, C. Dynamics of a microbial community during ensiling and upon aerobic exposure in lactic acid bacteria inoculation-treated and untreated barley silages, **Bioresource Technology**, 273, 212-219, 2019.

Macêdo, A. J. S.; Santos, E. M.; Araújo, G. G.L.; Edvan, R. L.; Oliveira, J. S.; Perazzo, A. F.; Sá, W. C. C. S.; Pereira, D. M. Silages in the form of diet based on spineless cactus and buffelgrass. **African Journal of Range & Forage Science**, 1–9, 2018.

Ma, T.; Suzuki, Y.; Guan, L. L. Dissect the mode of action of probiotics in affecting host-microbial interactions and immunity in food producing animals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 205, 35-48, 2018.

McAllister, T. A.; Dunière, L.; Drouin, P.; Xu, S.; Wang, Y.; Munns, K.; Zaheer, R. Silage review: Using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. **Journal of Dairy Science**, 101(5), 4060–4074, 2018.

Mokoboki, K.; Sebola, N.; Matlabe, G. Effects of molasses levels and growing conditions on nutritive value and fermentation quality of *Opuntia cladodes* silage. **Journal of Animal & Plant Sciences**, 28, 4488-4495, 2016.

Matsuhiro, B.; Lillo, L. E.; Sáenz, C.; Urzúa, C. C.; Zárate, O. Chemical characterization of the mucilage from fruits of *Opuntia ficus indica*. **Carbohydrate Polymers**, 63(2), 263–267, 2006.

Mcitekah, H. 2008. Fermentation characteristics and nutritional value of *Opuntia-fiscus* var *fusicaulis* cladode silage. Ph.D. Thesis, Faculty of Natural and Agricultural Sciences. University of Free State. Bloemfontein.

Moraes, R. L.; Ribeiro, K. G.; Pereira, O. G.; Marcondes, M. I.; Cardoso, L. L. Silagem de cana-de-açúcar tratada com inoculantes microbianos e suas misturas. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, 7, 3, 76-83, 2017.

Mohd-Setapar, S. H.; Abd-Talib, N.; Aziz, R. Review on Crucial Parameters of Silage Quality. **APCBEE Procedia**, 3, 99–103, 2012.

Martins, F. H.; Guth, B. E. C.; Piazza, R. M. F.; Elias, W. P.; Leão, S. C.; Marzoa, J.; Dahbi, G.; Mora, A.; Blanco, M.; Blanco, J.; Pelayo, J. S. Lambs are an important source of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, 196, 72–77, 2016.

Martins, F. H.; Guth, B. E. C.; Piazza, R. M. F.; Leão, S. C.; Ludovico, A.; Ludovico, M. S.; Dahbi, G.; Marzoa, j.; Mora, A.; Blanco, J.; Pelayo, J. S. Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep flocks of Paraná State, southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, 175(1), 150–156, 2015.

Mariz, L. D. S.; Valadares Filho, S. C.; Detmann, E.; Pereira, O. G.; Pereira, L. G. R.; Marcondes, M. I.; Santos, S. A.; Villadiego, F. A. C.; Zanetti, D.; Prados, L. F.; Nunes, A. N. Intake and ruminal digestion determined using omasal and reticular digesta samples in cattle fed diets containing sugar cane in natura or ensiled sugar cane compared with maize silage. **Livestock Science**, 155, 71–76, 2013.

Nadaf, S. K.; Safa'a, M.; Al-Farsi, S. A.; Al-Hinai, A. S.; Al-Hinai, A. A. S.; Al-Harthy, S. A.; Al-Khamisi.; Al-Bakri, A. N. Potential of forage cactus pear accessions under saline water irrigation in arid areas. **JPACD**, (20): 68-81, 2018.

Nkosi, B. D.; Meeske, R. Effects of ensiling totally mixed potato hash ration with or without a heterofermentative bacterial inoculant on silage fermentation, aerobic stability, growth performance and digestibility in lambs. **Animal Feed Science and Technology**, 161(1-2), 38–48, 2010.

Nogueira, M. S. **Perfil fermentativo e composição química de silagens de palma forrageira enriquecidas com fontes proteica, energética e fibrosa**. Areia: UFPB, 2015. 58 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2015.

Ni, K., Wang, F., Zhu, B., Yang, J., Zhou, G., Pan, Y., Zhong, J., 2017. Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on the microbial community and fermentation quality of soybean silage. **Bioresource Technology**, 238, 706-715, 2017.

Oliveira, M. R.; Neumann, M.; Ueno, R. K.; Neri, J.; Marafon, F. Avaliação das perdas na ensilagem de milho em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, 12, 3, 319-325, 2013.

Oliveira, M. R.; Neumann, M.; Oliboni, R.; Gobetti, S. T. C.; Faria, M. V. Uso de aditivos biológicos na ensilagem de forrageiras. **Ambiência Guarapuava** (PR), 7, 3, 589-601, 2011.

Ozduven, M. L.; Koç, F.; Akay, V. Effects of Bacterial Inoculants and Enzymes on the Fermentation, Aerobic Stability and in vitro Organic Matter Digestibility Characteristics of Sunflower Silages. **Pakistan Journal of Nutrition**, 16 (1): 22-27, 2017.

Pahlow, G.; Muck, R. E.; Driehuis Riehuis. F.; Oude Elferink Lferink, S. J. W. H. Spoelstra Poelstra, S. F. (2002) **Microbiology of ensiling**. In: Buxton D.R., Muck R.E. Madison H.J.H. (eds) *Silage Science and Technology*. Madison: American Society of Agronomy (in press).

Pan, T.; Xiang, H.; Diao, T.; Ma, W.; Shi, C.; Xu, Y.; Xie, Q. Effects of probiotics and nutrients addition on the microbial community and fermentation quality of peanut hull. **Bioresource Technology**. 273, 144-152, 2019.

Queiroz, O. C. M.; Ogunade, I. M.; Weinberg, Z.; Adesogan, A. T. Silage review: Foodborne pathogens in silage and their mitigation by silage additives. **Journal of Dairy Science**, 101(5), 4132–4142, 2018.

Reyes-Aguero, J. A.; Rivera, J. R. A. Agrobiodiversity of cactus pear (*Opuntia*, Cactaceae) in the Meridional Highlands Plateau of Mexico. **Journal of Natural Resources and Development**, 01: 01-09, 2011.

Ranjan, P.; Ranjan, J. K.; Misra, R. L.; Dutta, M.; Singh, B. Cacti: notes on their uses and potential for climate change mitigation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 63(5), 901–917, 2016.

Rego, M. M. T.; Lima, G. F. C.; Silva, J. G. M.; Guedes, F. X.; Dantas, F. D. G.; Lôbo, R. N. B. Morfologia e Rendimento de Biomassa da Palma Miúda Irrigada sob Doses de Adubação Orgânica e Intensidades de Corte. **Revista Científica de Produção Animal**, 16, 2, 118-130, 2014.

Rodrigues, A. M.; Pitacas, F.I.; Reis, C. M. G.; Blasco, M. Nutritional value of *opuntia ficus-indica* cladodes from portuguese ecotypes. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, 22, 40-45, 2016.

Rabelo, C. H. S.; Basso, F. C.; Lara, E. C.; Jorge, L. G. O.; Härter, C. J.; Mesquita, L. G.; Silva, L. F. P.; Reis, R. A. Effects of *Lactobacillus buchneri* as a silage inoculant and as a probiotic on feed intake, apparent digestibility and ruminal fermentation and microbiology in wethers fed low-dry-matter whole-crop maize silage. **Grass and Forage Science**, 73(1):67–77, 2018.

Rabelo, C. H. S.; Basso, F. C.; Lara, E. C.; Jorge, L. G. O.; Härter, C. J.; Mesquita, L. G.; Silva, L. F. P.; Reis, R. A. Effects of *Lactobacillus buchneri* as a silage inoculant and as a

probiotic on feed intake, apparent digestibility and ruminal fermentation and microbiology in wethers fed low-dry-matter whole-crop maize silage. **Grass and Forage Science**, 1–11, 2017.

Romero, J. J.; Joo, Y.; Park, J.; Tiezzi, F.; Gutierrez-Rodriguez, E.; Castillo, M. S. Bacterial and fungal communities, fermentation, and aerobic stability of conventional hybrids and brown midrib hybrids ensiled at low moisture with or without a homo- and heterofermentative inoculant. **Journal of Dairy Science**, 101(4), 3057–3076, 2018.

Raabis, S.; Li, W.; Cersosimo, L. Effects and immune responses of probiotic treatment in ruminants. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2019.

Shedbalkar, U. U.; Adki, V. S.; Jadhav, J. P.; Bapat, V. A. Opuntia and Other Cacti: Applications and Biotechnological Insights. **Tropical Plant Biology**, 3(3), 136–150, 2010.

Srivesharam, S.; Park, H. S.; Soundharrajan, I.; Kuppusamy, P.; Kim, D. H.; Jayraaj, I. A.; Lee, K. D.; Choi, K. C. Evaluation of probiotic *Lactobacillus plantarum* against foodborne pathogens and its fermentation potential in improving *Lolium multiflorum* silage quality. 3 **Biotech, Springer**, 8:443, 2018

Souza, T. C.; Santos, M. V. F.; Dubeux Júnior, J. C. B.; Lira, M. A.; Santos, D. C.; Cunha, M. V.; Lima, L. E.; Silva, R.R. Productivity and nutrient concentration in spineless cactus under different fertilizations and plant densities. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, 12, 4, 555-560, 2017.

Souza, L. C.; Zambom, M. A.; Alcalde, C. R.; Fernandes, T.; Castagnara, D. D.; Radis, A. C.; Santos, S. M. A.; Possamai, A. P.; Pasqualotto, M. Feed intake, nutrient digestibility, milk production and composition in dairy cows fed silage of wet brewers grain. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, 37, 2, 1069-1080, 2016.

Silva, E. T. D. S.; Melo, A. A. S. D.; Ferreira, M. D. A.; Oliveira, J. C. V. D.; Santos, D. C. D.; Silva, R. C.; Inácio, J. G. ‘Acceptability by Girolando heifers and nutritional value of erect prickly pear stored for different periods’. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 52, 9, 761-767, 2017.

Sá Neto, A.; Nussio, L.G.; Zopollatto, M.; Junges, D.; Bispo, A.W. Silagem de milho ou de cana-de-açúcar com *Lactobacillus buchneri* exclusivamente ou em associação com *L. Plantarum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 48, 528-535, 2013.

Schreiter, S.; Sandmann, M.; Smalla, K.; Grosch, R. Soil Type Dependent Rhizosphere Competence and Biocontrol of Two Bacterial Inoculant Strains and Their Effects on the Rhizosphere Microbial Community of Field-Grown Lettuce. **Plos One**, 9, 103- 726, 2014.

Silva, J. G.; Queiroz, M. A. A.; Araujo, G. G. L.; Silva, B. G.; Cunha, J. A.; Rodrigues, P. H. M. Características fermentativas de silagens de cana-de-açúcar com erva-sal. **Ciência Rural**, 44, 2014.

Saenz, C. Processing technologies: an alternative for cactus pear (*Opuntia* spp.) fruits and cladodes. **Journal of Arid Environments**, 46(3), 209–225, 2000.

Salvo, P. A. R.; Basso, F. C.; Rabelo, C. H. S.; Oliveira, A. A.; Sader, A. P.; Casa grande, D. R.; Berchielli, T. T.; Reis, R. A. Características de silagens de milho inoculadas com *Lactobacillus Buchneri* E *L. Plantarum*. **Archivos de Zootecnia**, 62 379-390, 2013.

Santos, A. O.; Ávila, C. L. S.; Schwan, R. F. Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage. **Journal of Dairy Science**, 96(12), 7777–7789, 2013.

Santos, M. C.; Kung, L. Short communication: The effects of dry matter and length of storage on the composition and nutritive value of alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**, 99(7), 5466–5469, 2016.

Sepúlveda, E.; Sáenz, C.; Aliaga, E.; Aceituno, C. Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. **Journal of Arid Environments**, 68(4), 534–545, 2007.

Stoškus, R.; Jatkauskas, J.; Vrotniakienė, V.; Juozaitienė, V. The effect of the bacterial inoculant on the ensiled lucerne fermentation characteristics, microbial population and the aerobic stability in the mini-silos. **Veterinarija ir zootechnika** (Vet Med Zoot). T. 76 (98), 2018.



Tenaillon, O.; Skurnik, D.; Picard, B.; Denamur, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, 8(3), 207–217, 2010.

Uden, P. Fresh and ensiled forage plants – total composition, silage losses and the prediction of silage composition from the crop. **Grass and Forage Science**, 73:420–431, 2017.

Ventura-Aguilar, R. I.; Bosquez-Molina, E.; Bautista-Baños, S.; Rivera-Cabrera, F. Cactus stem (*Opuntia ficus-indica* Mill): anatomy, physiology and chemical composition with emphasis on its biofunctional properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 97(15), 5065–5073, 2017.

Vohra, A.; Syal, P.; Madan, A. Probiotic yeasts in livestock sector. **Animal Feed Science and Technology**, 219, 31–47, 2016.

Weiss, K.; Kroschewski, B.; Auerbach, H. Effects of air exposure, temperature and additives on fermentation characteristics, yeast count, aerobic stability and volatile organic compounds in corn silage. **Journal of Dairy Science**, 99(10), 8053–8069, 2016.

Windle, M. C.; Kung, L. Factors affecting the numbers of expected viable lactic acid bacteria in inoculant applicator tanks. **Journal of Dairy Science**, 99(11), 9334–9338, 2016.

Wilkinson, J. M.; Rinne, M. Highlights of progress in silage conservation and future perspectives. **Grass and Forage Science**, 73:40–52, 2018.

Weinberg, Z. G.; Shatz, O.; Chen, Y.; Yosef, E.; Nikbahat, M.; Ben-Ghedalia, D.; Miron, J. Effect of Lactic Acid Bacteria Inoculants on In Vitro Digestibility of Wheat and Corn Silages. **Journal of Dairy Science**, 90(10), 4754–4762, 2007.

Weinberg, Z. G.; Chen, Y.; Volchinski, V.; Sela, S.; Ogunade, I. M.; Adesogan, A. An in vitro model to study interactions between *Escherichia coli* and lactic acid bacterial inoculants for silage in rumen fluid. **Letters in Applied Microbiology**, 63, 60–65, 2016.

Weinberg, Z.G.; Muck, R.E.; Weimer, P.J. The survival of silage inoculant lactic acid bacteria in rumen fluid. **Journal of Applied Microbiology**, 94, 1066–1071, 2003.

Waal, H. O.; Zeeman, D.C.; Combrinck, W. J. Wet faeces produced by sheep fed dried spineless cactus pear cladodes in balanced diets. **South African Journal of Animal Science**, 36, 2006.

Weinberg, Z. G.; Muck, R. E.; Weimer, P. J.; Chen, Y.; Gamborg, M. Lactic Acid Bacteria Used in Inoculants for Silage as Probiotics for Ruminants. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 118, 1-9, 2004.

Yahia, E. M.; Sáenz, C. Cactus pear ( Opuntia species). **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits**, 290–331, 2011.

Yan, Y.; Li, X.; Guan, H.; Huang, L.; Ma, X.; Peng, Y.; Li, Z.; Nie, G.; Zhou, J.; Yang, W.; Cai, Y.; Zhang, X. Microbial community and fermentation characteristic of Italian ryegrass silage prepared with corn stover and lactic acid bacteria. **Bioresource Technology**, 2019.

Yuan, X. J.; Wang, J.; Guo, G.; Wen, A. Y.; Desta, S. T.; Shao, T. Effects of ethanol, molasses and Lactobacillus plantarum on fermentation characteristics and aerobic stability of total mixed ration silages. **Grass and Forage Science**, 71, 328–338, 2016.

Yitbarek, M. B.; Tamir, B. Silage Additives: Review. **Open Journal of Applied Sciences**, 4, 258-274, 2014.

Yanti, Y.; Kawai, S.; Yayota, M. Effect of total mixed ration silage containing agricultural by-products with the fermented juice of epiphytic lactic acid bacteria on rumen fermentation and nitrogen balance in ewes. **Tropical Animal Health and Production**, 1-9, 2019.

Zailan, M. Z.; Yaakub, H.; Jusoh, S. Yield and nutritive quality of napier (pennisetum purpureum) cultivars as fresh and ensiled fodder. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, 28(1): 63-72, 2018.

## **Capítulo I**

---

**Seleção de bactérias lácticas na planta e na silagem de *Nopalia spp.* e seus efeitos na fermentação e estabilidade aeróbia da silagem**

## **Seleção de bactérias lácticas na planta e na silagem de *Nopalia spp.* e seus efeitos na fermentação e estabilidade aeróbia da silagem**

### **RESUMO**

Objetivou-se selecionar estirpes de bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas da planta e da silagem de palma forrageira e avaliar seus efeitos na fermentação e estabilidade aeróbia da silagem. Quarenta isolados classificados como BAL foram isolados da planta e da silagem de palma forrageira e avaliados quanto à produção de metabólitos e identificados por meio do sequenciamento do 16S rDNA. Os isolados foram identificados como *Lactobacillus plantarum*, *Weissella cibaria*, *Weissella confusa* e *Weissella paramesenteroides*. O uso de inoculantes não influenciou ( $P > 0,05$ ) as perdas por gases e efluentes nas silagens de palma forrageira. A população de bactérias do ácido láctico (BAL) carboidratos solúveis em água (CSA) e nitrogênio amoniacal diferiram ( $P < 0,001$ ) entre as silagens. As silagens inoculadas com a estirpe GP15 apresentaram a maior população de BAL. As silagens inoculadas com a estirpe GP1 apresentaram as maiores CSA. As populações de enterobactérias, leveduras e fungos estavam abaixo do limite mínimo de detecção ( $< 2,0 \log \text{ufc} / \text{g}$  de silagem) em todas as silagens estudadas. A diversidade microbiana é observada na silagem de *Nopalea spp.*, com predomínio de BAL do gênero *Weissella* na planta e do gênero *Lactobacillus* em silagens de *Nopalea spp.* A ação predominante dos inoculantes foi a maximização da recuperação de MS das silagens, que poderia ser o critério adotado para selecionar as estirpes de BAL para uso como inoculantes nas silagens de *Nopalea spp.*

**Palavras-chave:** ácidos graxos voláteis, inoculante microbiano, *Lactobacillus plantarum*  
perda de matéria seca

**Selection of lactic bacteria in plant and *Nopalía spp.* and its effects on fermentation and aerobic stability of silage**

**ABSTRACT**

The aim of this study was to select strains of lactic acid bacteria (LAB) isolated from forage cactus plant and silage and to assess their effects on silage fermentation and aerobic stability. Forty isolates classified as LAB were isolated from plant and cactus silage and evaluated for metabolite production, and identified by sequencing of 16S rDNA. The wild isolates were identified as *Lactobacillus plantarum*, *Weissella cibaria*, *Weissella confusa* and *Weissella paramesenteroides*. The use of inoculants did not influence ( $P > 0.05$ ) the gas and effluent losses in forage cactus silages. The lactic acid bacteria (LAB) population water-soluble carbohydrates (CS) and ammonia nitrogen differed ( $P < 0.001$ ) among the silages. The silages inoculated with GP15 strain showed the highest LAB population. The silages inoculated with GP1 strain presented the highest CS. The enterobacteria and yeasts and moulds populations were below the minimum detection limit ( $<2.0 \log \text{ cfu/g silage}$ ) in all silages studied. The microbial diversity is observed in *Nopalea spp.* silage, with BAL predominance of the genus *Weissella* in the plant and of the genus *Lactobacillus* in *Nopalea spp.* silages. The predominant action of inoculants was the maximized DM recovery of the silages, which could be the criterion adopted to select strains of LAB for use as inoculants in *Nopalía* a silages.

**Keywords:** volatile fatty acids, microbial inoculant, *Lactobacillus plantarum*, Dry matter loss

## **1. Introdução**

A palma forrageira também é reconhecida por sua conservação como silagem. Apesar do elevado teor de umidade, a formação de mucilagem pode diminuir a atividade da água, controlando o desenvolvimento de clostrídios e enterobactérias, além de reduzir as perdas por efluentes (Gusha et al., 2013; Toit et al., 2018). No entanto, a alta concentração de carboidratos solúveis em água (CSA) presente na palma pode favorecer o crescimento das leveduras, resultando em fermentação alcoólica e, consequentemente, alta perda de matéria seca (Gusha et al., 2013; Macêdo et al., 2018). No entanto, essas características podem resultar em silagens altamente suscetíveis à deterioração após a abertura do silo, o que pode comprometer o uso da silagem de *Nopalea spp.* para alimentação animal.

Dadas as limitações mencionadas acima e visando a produção bem sucedida de silagem de *Nopalea spp.* de boa qualidade, algumas estratégias de manejo devem ser adotadas. Inoculantes microbianos são amplamente utilizados para essa finalidade e têm sido eficientes em promover melhorias durante o perfil fermentativo e garantir que a forragem seja adequadamente preservada (Kleinschmit e Kung, 2006; Schmidt et al., 2009; Carvalho et al., 2014; Silva et al., 2018). Sifeeldein et al. (2018) citam que inoculantes produzidos a partir de estirpes de bactérias ácido lácticas (BAL) adaptadas às condições específicas da planta forrageira, podem ser utilizadas para melhorar a eficiência da fermentação da silagem.

No entanto, nenhuma pesquisa anterior avaliou o potencial de culturas lácticas isoladas da *Nopalea spp.* como inoculantes para silagem. No presente estudo, foi hipotetizado que as estirpes de BAL isoladas de silagem de palma forrageira poderiam melhorar o padrão de fermentação e aumentar a estabilidade aeróbia das silagens de palma. Para testar esta teoria, estirpes de BAL isoladas de palma forrageira e silagem foram selecionadas e avaliadas quanto aos seus efeitos na fermentação da silagem e na estabilidade aeróbica.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Isolamento e caracterização de BAL a partir de silagem e da planta de palma forrageira**

#### **2.1.1. Localização e preparação da silagem**

O estudo foi realizado no Laboratório de Forragem do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba (Campus II, Areia, Paraíba, Brasil), localizado na microrregião do Brejo Paraibano (6 ° 57'46 " S, 35 ° 41'31 "W).

Amostras de toda a planta da espécie *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck cv. Miúda foi obtida da Agência Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA-PB) no município de Tacima, Paraíba, Brasil, localizada na mesorregião do Agreste Paraibano (6 ° 29'16 "S, 35 ° 38'13" W), com idade de rebrotação de com 2 anos, todos os cladódios foram coletados, preservando apenas o cladódio primário por planta.

A palma forrageira foi cortada em um comprimento teórico de 2 cm utilizando-se uma colhedora JF-92 Z10 (JF Agricultural Machinery, São Paulo, Brasil) e acondicionada em baldes plásticos de polivinil (PVC) (mini-silos de 15 cm de diâmetro e 40 cm de comprimento). Os mini-silos foram armazenados à temperatura ambiente e abertos depois de 60 dias da ensilagem.

### **2.1.2. Isolamento e identificação de BAL**

As BAL foram isolados de 25 g das forragens frescas que foram homogeneizadas com 225 mL de solução de Ringer estéril (Ring Solution®, Oxoid, England, Hampshire), com auxílio de liquidificador industrial por cerca de 1 minuto. Posteriormente, foram preparadas diluições em série de 10 vezes em ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Difco, São Paulo, Brasil), utilizando placas de fluidos, e incubadas a 37 ° C por 48 horas antes da enumeração. As colônias foram contadas em placas que tinham 30 a 300 unidades formadoras de colônia (ufc).

A partir de placas com MRS contendo colônias bem isoladas, a raiz quadrada da contagem total de colônias foi tomada aleatoriamente para identificação (Holt et al., 1994). Os isolados foram ainda purificados por colônias individuais em estrias em ágar MRS contendo púrpura de bromocresol e CaCO<sub>3</sub> como indicadores. Todas as BAL foram detectadas por uma colônia amarelada e uma zona clara causada pela dissolução de CaCO<sub>3</sub>. Os isolados foram cultivados em ágar MRS para posterior purificação por riscagem em ágar MRS. As culturas pré selecionadas crescidas em 5 mL de caldo MRS a 37 ° C durante 18 h, foram utilizadas para sequenciamento do gene de DNA ribossômico 16S (rDNA). Primeiro, o DNA foi extraído usando um kit comercial (kit de Purificação Genomic DNA Wizard®, Promega, Madison, WI, EUA) com as seguintes modificações. As amostras foram centrifugadas (Mikro 200R, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) a 10.000 × g por 5 min e lavadas com solução salina a 0,85%. As células foram ressuspensas em 480 µl de EDTA 50 mM e imediatamente

adicionadas a 50 µl de lisozima 50 mg / ml. A concentração de DNA genômico foi avaliada em um espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e estocado a -20 ° C até o uso. A região de codificação da sequência do gene 16S rDNA foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) em um termociclador de PCR (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha).

As sequências do gene 16S rDNA foi amplificada por PCR, utilizando iniciadores universais P027F (5 'GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1492R (5 'TACGG (C / T) TACCTTGTTACGACTT 3') (Heuer et al., 1997 ). A reação de PCR foi realizada em tubos de microcentrífuga contendo 50 µL da seguinte mistura de reação: DNA (aproximadamente 60 ng); tampão da reação 10X (Tris-HCl 0,1 mol / L, pH 8,0 e KCl 0,5 mol / L); MgCl<sub>2</sub> (1,5 mmol / L, pH 8,0); mistura de dNTP (Promega); DNA polimerase GoTaq® (Promega); primers (0,6 µmol/L de P027F e 1492R, respectivamente) e água milli-Q autoclavada. As condições das reações foram as seguintes: 94 ° C / 5 min; 30 ciclos (desnaturação: 94 ° C / 30 s; 60 ° C / 30 s); polimerização: 72 ° C / 2 min; extensão final a 72 ° C / 5 min. A mistura da reação de PCR foi verificada por eletroforese em gel de agarose (2%) com tampão Tris-borato-EDTA (Thermo Scientific). As bandas foram visualizadas sob luz UV após coloração com 0,5 mg / mL de brometo de etídio. O produto de PCR foi enviado para Macrogen © (Seoul, Korea) para purificação e sequenciamento. Pesquisas de similaridade de sequência foram realizadas usando o banco de dados GenBank DNA e a ferramenta básica de busca de alinhamento local para nucleotídeos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). As sequências do gene 16S rRNA que apresentaram uma similaridade maior que 97% foram consideradas pertencentes à mesma unidade taxonômica operacional (Altschul et al., 1990).

### **2.1.3. Pré-seleção de estirpes de BAL com base na produção de metabólitos no caldo MRS**

Quarenta isolados classificados como BAL foram isolados de silagem e da planta de palma forrageira e avaliados quanto à produção de metabólitos. Os isolados também foram examinados pela coloração de Gram e atividade da catalase (Tabela 1).

Para avaliar a capacidade de produção de ácido lático e ácido acético, os isolados foram cultivados em caldo MRS a 37 ° C por 24 hs. Posteriormente, o inóculo foi padronizado para uma densidade óptica de 1,0 a 600 nm, utilizando um espectrofotômetro. Subsequentemente, 0,1 mL deste inóculo foi adicionado a 50 mL de caldo MRS e depois armazenado a 35 ° C durante 24 hs. Após a fermentação, amostras das culturas foram coletadas



para avaliar a produção de metabólitos por cromatografia líquida de alta eficiência (Siegfried et al., 1984).

Para avaliar as linhagens em silos experimentais, 10 linhagens de BAL foram escolhidas com base na capacidade de produção de ácido láctico e ácido acético. Cinco das BAL selecionadas produziram mais ácido láctico do que ácido acético (GP21, GP22, GP23, GP24 e GP31) e cinco outras produziram mais ácido acético do que ácido láctico (GP1, GP2, GP3, GP5 e GP15).

## **2.2. Avaliação das estirpes nas silagens experimentais**

### **2.2.1. preparação de silagem**

A silagem foi preparada a partir de palma forrageira recém-colhida de plantas com aproximadamente 24 meses de idade. A palma forrageira foi cortada a um comprimento teórico de 2 cm usando uma colheitadeira de forragem JF-92 Z10 (JF Agricultural Machinery). Três quilos de material picado foram misturados aos inoculantes e acondicionados em baldes plásticos de PVC (mini-silos de 15 cm de diâmetro e 40 cm de comprimento). Os silos de PVC foram equipados com a válvula de Bunsen (que permitia a saída de gás) e 1,5 kg de areia no fundo (para drenar o efluente). Em seguida, os silos foram selados, pesados e armazenados em área coberta à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) por 60 dias. Quatro repetições foram preparadas para cada tratamento.

A silagem foi produzida utilizando 10 estirpes de BAL selecionadas do primeiro experimento (secção 2.1.3), com inoculantes. A silagem sem inoculante foi usada como controle. Para todos os tratamentos, a taxa de aplicação teórica foi de  $1,0 \times 10^6$  ufc/g de forragem fresca. Os inoculantes microbianos foram primeiro plaqueados em ágar MRS para confirmar a sua viabilidade, e foram utilizadas quantidades apropriadas dos inoculantes para atingir a taxa de aplicação desejada. Todos os inoculantes foram inicialmente dissolvidos em 50 mL de água destilada pura e depois pulverizados uniformemente sobre a forragem, sob mistura constante. A mesma quantidade de água usada para diluí-los foi aplicada no material não tratado. Um pulverizador foi utilizado para cada tratamento, para evitar a contaminação cruzada.

### **2.2.2. Coleta de amostras**

No momento da ensilagem e no dia da abertura do silo, retiraram-se 300g MN da forragem fresca e de cada mini-silo. As amostras de forragem fresca foram analisadas para as populações microbianas, matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e extrato etéreo (EE) (Tabela 2).

Para as populações microbianas, 25 g da forragem fresca e 25 g da silagem de palma foram homogeneizados com 225 mL de solução de Ringer estéril (Oxoid) em um misturador industrial por 1 min. O pH do extrato de água foi aferido. Uma porção do extrato de água foi filtrada através de uma dupla camada de gaze em um tubo estéril, para análises microbianas. Outra porção do extrato aquoso foi acidificada com  $H_2SO_4$  a 50% (pH <2,0) e congelada para posterior análise. Para a enumeração, isolamento e identificação, foram feitas diluições em série na solução de Ringer estéril. Para a contagem de BAL, as amostras foram plaqueadas em MRS (Difco) utilizando placas de petri e incubadas a 37 ° C durante 48 hs antes da contagem. As enterobactérias foram enumeradas por amostras de plaqueamento em ágar de bile vermelho violeta (Difco) e incubadas como descrito acima para BAL. Os mofo e leveduras (ML) foram quantificados por meio da técnica de pour-plating em ágar batata-dextrose (Difco) que foi acidificada pela adição de 1,5% de ácido tartárico a 10% (p / v) e as placas foram incubadas a 25 ° C por 5 d. As colônias foram contadas a partir de placas de diluições apropriadas contendo 30 a 300 ufc.

As concentrações de MS (método 934.01), MM (método 930.05), PB (método 984.13) e EE (método 920.85) foram determinadas conforme descrito pela Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, 1990). As amostras foram analisadas para FDN, segundo Mertens (2002), e CSA, conforme detalhado por Nelson (1944).

Além disso, amostras da silagem também foram avaliadas quanto ao pH, nitrogênio amoniacal ( $N-NH_3$ ) (Detmann et al., 2012), capacidade tamponante (Playne e McDonald, 1966), ácidos graxos voláteis (Siegfried et al., 1984) e perda de MS (Zanine et al., 2010).

A estabilidade aeróbica de cada silo foi determinada adicionando 3 kg de uma amostra de silagem ao seu respectivo silo e expondo-a ao oxigênio a 22 ° C. As temperaturas foram medidas a cada 10 min, usando-se registradores de dados (Escort Mini; Impac, São Paulo, Brasil) inseridos na massa de silagem no centro geométrico usando uma régua. Cada silo foi coberto com uma dupla camada de gaze esterilizada para evitar contaminação e secagem da silagem, mas permitindo que o ar se infiltrasse na massa da silagem. A estabilidade aeróbia foi definida como o número de horas em que a silagem permaneceu estável antes de um aumento de 2 ° C na temperatura da silagem (Kleinschmit e Kung, 2006). Os pesos das silagens foram registrados antes e aos 4 dias após a exposição aeróbia, para calcular a perda

de MS. As amostras de silagem exposta aerobicamente foram analisadas quanto a composição química e microbianas como descrito acima para forragens e silagens frescas.

### 2.3. Análise estatística

Todos os dados microbianos foram transformados em unidades de log e apresentados com base no peso úmido. Os dados químicos são fornecidos com base na MS. A normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias foram testadas pelo procedimento UNIVARIATE. O experimento que avaliou a fermentação anaeróbia foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 11 tratamentos e quatro repetições. A análise estatística foi realizada utilizando os procedimentos PROC MIXED do SAS (versão 9.4, SAS Institute, Inc., Cary, NC, EUA, 2012). As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott. Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos usando 0,05 como o nível de probabilidade crítico para um erro do tipo I.

## 3. Resultados

### 3.1. Isolamento, identificação e pré-seleção de estirpes de BAL

Todas as estirpes isoladas de plantas e silagens foram classificadas como gram positivas e catalase negativas (Tabela 1). As concentrações de ácido láctico (AL) e ácido acético (AA) variaram de 186,98 a 1866,62 mg / dm<sup>3</sup> e de 46,38 a 594,60 mg / dm<sup>3</sup>, respectivamente (Tabela 3). Todas as estirpes apresentaram similaridade de seqüências igual ou superior a 96% quando comparadas ao banco de dados do GenBank utilizando o algoritmo BLAST (National Center for Biotechnology Information, Maryland, EUA). Os isolados foram identificados como *Lactobacillus plantarum*, *Weissella cibaria*, *Weissella confusa* e *Weissella paramesenteroides*. As espécies BAL mais prevalentes de palma forrageira e silagens foram *Lactobacillus plantarum* (65%) (Tabela 4).

### 3.2. Perda de MS e perfil fermentativo

O uso de inoculantes não influenciou ( $P > 0,05$ ) as perdas por gases e efluentes nas silagens de palma forrageira. Nas silagens inoculadas com as estirpes GP1, GP3, GP5, GP15, GP21, GP22, GP23, GP23, GP24 e GP31, foram encontradas maiores MS residuais em comparação com o controle (Tabela 5).

Os inoculantes não afetaram ( $P > 0,05$ ) o ácido láctico, ácido acético, relação ácido láctico/ ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, pH e capacidade tamponante das silagens (Tabela 6). O CSA e o  $N-NH_3$  diferiram ( $P < 0,001$ ) entre as silagens. As silagens inoculadas com a estirpe GP1 apresentaram os maiores teores de CSA. O uso de estirpes GP5, GP15, GP21, GP22, GP24 e GP31 e silagens controle resultaram em silagens com teores semelhantes de  $N-NH_3$ , que foram maiores que nas demais silagens (Tabela 6).

### 3.2.2. Características químicas e microbiológicas da silagem

Os inoculantes não afetaram ( $P > 0,001$ ) a MS, MM e a FDN das silagens (Tabela 7). A PB e EE diferiram ( $P < 0,01$ ) entre as silagens. As silagens inoculadas com as estirpes GP1, GP2, GP3, GP5 e GP31, apresentaram teores de PB semelhantes entre si e não diferiram da silagem controle e foram superiores às encontradas nas silagens inoculadas com GP15, GP21, GP22, GP23. e GP24. As silagens inoculadas com as estirpes GP2, GP15 e GP 21 apresentaram os maiores teores de EE.

A população de BAL diferiu ( $P < 0,001$ ) entre as silagens (Tabela 8). As silagens inoculadas com a estirpe GP15 apresentaram a maior população de BAL. As populações de enterobactérias e ML estavam abaixo do limite mínimo de detecção ( $< 2,0 \log \text{ ufc / g}$  de silagem) em todas as silagens estudadas. Os inoculantes não afetaram a estabilidade aeróbia das silagens de palma forrageira (Tabela 8).

## 4. Discussão

BAL são microrganismos gram positivos, catalase negativos e não formadores de esporos, e seu metabolismo resulta em alta produção de ácido láctico (AL) (Reina Asa et al., 2010).

Inoculantes microbianos produzidos a partir de estirpes de BAL homofermentativo apresentam potencial para conversão de CSA em lactato; diminuindo assim o pH da massa ensilada. No entanto, algumas silagens podem favorecer o desenvolvimento de ML na abertura do silo, considerando necessário o uso de inoculantes heterofermentativos que produzem não apenas AL, mas também AA, uma vez que possui propriedades antifúngicas (Carvalho et al., 2014).

A presença das espécies de *L. plantarum* isoladas da planta pode ser considerada um potencial inoculante, pois favorece a produção de AL, promovendo a rápida acidificação da massa ensilada, inibindo microorganismos deletérios (Tabela 4).

BAL epifítica converte rapidamente CSA em ácidos orgânicos, diminuindo rapidamente o pH da silagem (Xu et al., 2017). Segundo os mesmos autores, algumas estirpes utilizadas como inoculantes podem competir com BAL presente na planta. Portanto, torna-se fundamental selecionar espécies que sobrevivam ao longo do processo de ensilagem (Xu et al., 2017).

O presente estudo verificou que a estirpe GP26, identificada como pertencente às espécies de *Weissella cibaria* - uma BAL heterofermentativa obrigatória - embora não pertencente ao grupo dos maiores produtores de ácido acético, foi selecionada no final do processo de fermentação. Não foi utilizada como inoculante devido, não ter atingido os resultados esperados. Além disso, vale ressaltar que *W. cibaria* é classificada entre as espécies com atividades antimicrobiana e antifúngica (Ndagano et al., 2011). A sobrevivência desta espécie nas condições ácidas do silo pode inibir microrganismos indesejáveis no material ensilado e melhorar a estabilidade aeróbica.

A identificação de estirpes da microbiota epifítica e após a fermentação da massa visa à produção de inoculante microbiano, capaz de promover um perfil fermentativo adequado. Além disso, pode reduzir as perdas de gases e efluentes, acarretando maior recuperação de MS da silagem de *Nopalea spp*, além de aumentar a estabilidade aeróbia das silagens.

Silagens com menos de 30% de MS podem não favorecer microrganismos deletérios, como os clostrídeos. Essa situação ocorre quando a fermentação é predominantemente realizada pelas BAL, que inibe a ação de microrganismos intolerantes à acidez da silagem, resultando em diminuição das perdas fermentativas e aumento da recuperação da MS (Kung Jr. et al., 2018).

Ao analisar a composição química da *Nopalea spp*, ela seria presumivelmente considerada uma planta propensa a altas perdas, principalmente devido ao reduzido teor de MS. Além disso, o alto teor de açúcar pode levar a uma fermentação excessiva, predominantemente realizada por leveduras. No entanto, quando processado, a *Nopalea spp*. libera um gel viscoso chamado mucilagem (substância rica em polissacarídeos: arabinose, galactose, xilose, ramnose, glicose e ácido urônico) (Felkai-Haddache et al., 2015; Kalegowda et al., 2016), que é hidrofóbico e evita o escoamento da água retida da planta, reduzindo as perdas por efluentes (Toit et al., 2018).

A formação da mucilagem influencia diretamente a retenção dos líquidos presentes na massa ensilada, inibindo as perdas fermentativas e, conseqüentemente, resultando em elevada recuperação da MS (Monrroy et al., 2017). Uma vez que o problema relacionado à produção de efluentes é minimizado pela presença de mucilagem, o foco pode estar no uso de

inoculantes para evitar a fermentação alcoólica ou mesmo a fermentação por enterobactérias. Desse modo a atuação dos inoculantes no aumento da recuperação de matéria seca, se deve, provavelmente a um controle mais efetivo da fermentação (Gusha et al., 2015).

Segundo Arriola et al. (2015) e Pholsen et al. (2016), para melhorar o perfil fermentativo da silagem, um inoculante homofermentativo deve ser utilizado, pois diminui o pH rapidamente devido à alta produção de ácido láctico, resultando em baixas perdas de MS. Em contraste, o inoculante heterofermentativo apresenta resultados positivos na abertura do silo, devido à produção de ácido acético que controla a proliferação de ML.

Neste contexto, uma característica interessante da silagem de *Nopalea spp.* é a elevada concentração de AA, favorecendo o crescimento de BAL heterofermentativa pelo lento declínio do pH das silagens, devido à presença de substâncias tamponantes, como oxálico, málico, cítrico, ácido malônico, succínico e tartárico que resulta do metabolismo ácido das crassuláceas (Abidi et al., 2009; Petera et al., 2015; Isaac, 2016). Alguns destes ácidos podem exercer ação antifúngica, que está associada ao elevado teor de AA que garante alta estabilidade aeróbia da silagem de *Nopalea spp.*, como observado no presente estudo, uma vez que nenhuma das silagens avaliadas quebrou a estabilidade aeróbia durante as 99 hs de exposição ao oxigênio.

A *Nopalea spp.* apresenta elevadas quantidades de CSA em sua composição (125,0 g / kg), favorecendo maior produção de AL em relação aos demais ácidos. Por outro lado, todas as silagens apresentaram altas concentrações de AA, o que pode ser atribuído a uma redução menos significativa do pH das silagens, favorecendo o crescimento de BAL heterofermentativa na fase inicial do processo de ensilagem. Este fato é interessante porque, considerando que todas as silagens apresentaram concentrações de AA próximas ou acima de 10 g / kg, elas podem ser aerobicamente estáveis (Kung et al., 2001).

O teor de N-NH<sub>3</sub> está relacionado à proteólise que ocorre durante o processo de fermentação, resultante do crescimento de microrganismos indesejáveis, como clostrídios e enterobactérias (Muck, 2010). Costa et al. (2016) afirmam que as silagens bem fermentadas devem apresentar teores de N-NH<sub>3</sub> abaixo de 100 g / kg de nitrogênio total. Desta forma, as silagens de *Nopalea spp.* apresentaram adequado perfil fermentativo, uma vez que as proporções de N-NH<sub>3</sub> para o total de nitrogênio estavam na faixa de 0,99 a 2,63.

A hidrólise protéica ocorre durante a fermentação da massa ensilada, gerando moléculas, como compostos nitrogenados solúveis, amônia, aminoácidos livres e peptídeos bioativos, que possuem funções relacionadas às características probióticas dos *L. plantarum* (Crowley et al., 2013 Li et al., 2018). Sob condições limitadas de nutrientes, as BAL pode

derivar a energia necessária para o seu metabolismo a partir do catabolismo desses aminoácidos. No entanto, este sistema varia entre as estirpes da mesma espécie e diferentes espécies de BAL (Shah et al., 2017; Ke et al., 2018). O reduzido teor de proteína pode ser indicativo da atividade proteolítica de algumas estirpes utilizadas no presente estudo, o que requer investigação adicional no nível de expressão gênica para confirmar o desempenho de enzimas proteolíticas sintetizadas por essas estirpes.

Quantidades menores de BAL foram encontradas no final do período de fermentação quando comparadas com a planta *in natura*, fato também evidenciado por vários autores (Moon et al., 1981; Alli et al., 1983; Pedroso et al., 2005; Filya e Sucu, 2010). Em geral, as BAL se multiplicam rapidamente nos primeiros dias de fermentação, coincidindo com o período de intensa acidificação da silagem (Li et al., 2015). Segue-se uma tendência de redução, com consequente estabilização da população BAL (Pedroso et al., 2005; Ávila et al., 2009; Filya e Sucu, 2010).

Por outro lado, observou-se que havia enterobactérias e ML presentes no final do processo fermentativo. O valor do pH e os níveis de ácidos orgânicos explicam este resultado, uma vez que o pH final foi abaixo do recomendado para enterobactérias (Weirich et al., 2018). Além disso, a presença de uma quantidade razoável de fermentação acética pode ter inibido populações fúngicas, especialmente leveduras. Kung et al. (2018) menciona que a silagem certamente será aerobicamente estável se houver controle efetivo das leveduras durante todo o período de fermentação.

Outro fato a considerar em relação à ensilagem de *Nopalea spp.* é a alta densidade obtida em função da presença de mucilagem, que agrega as partículas da planta, expelindo rapidamente o oxigênio do silo, contribuindo também para a inibição das populações fúngicas.

A análise dos resultados obtidos confirmou que a inoculação cumpriu sua função de desencadear a fermentação láctica e minimizar as perdas fermentativas, enquanto o alto teor de ácido acético contribuiu para garantir a estabilidade aeróbia das silagens avaliadas. É evidente que a elevada quantidade de CSA contribuiu para a acidificação da massa ensilada, enquanto o tamponamento atrasa um pouco a acidificação, levando ao alto consumo de açúcares e aumentando as perdas de MS. A inoculação provavelmente acelerou a acidificação, assim, garantindo elevada recuperação de MS ao final da fermentação. A ensilagem da *Nopalea spp.* com inoculantes da microbiota autóctone é demonstrada como uma técnica altamente eficiente.

Mesmo assim, mais estudos devem ser realizados para explorar o potencial desses microrganismos como inoculantes. Principalmente, investigar sua constituição genômica e

outras características favoráveis que essas estirpes podem agregar ao processo de silagem de *Nopalea spp.* ou até mesmo outras forrageiras utilizadas para ensilagem.

## 5. Conclusões

A diversidade microbiana é observada na silagem de *Nopalea spp.*, com predomínio de BALdo gênero *Weissella* na planta e do gênero *Lactobacillus* em silagens de *Nopalea spp.*

A ação predominante dos inoculantes foi a maximização da recuperação de MS das silagens, o que poderia ser o critério adotado para selecionar as estirpes de BAL para uso como inoculantes em silagens de *Nopalea spp.*

## 6. Referências

- Ávila, C.L.S., Pinto, J.C., Figueiredo, H.C.P., Schwan, R.F. 2009. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. Grass Forage Sci. 64, 384–394.
- Arriola, K.G., Queiroz, O.C.M., Romero, J.J., Casper, D., Muniz, E., Hamie, J., Adesogan, A.T. 2015. Effect of microbial inoculants on the quality and aerobic stability of bermudagrass round-bale haylage. J. Dairy Sci. 98, 478–485.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. J. Mol. Biol. 215, 403–410.
- Association of Analytical Chemists (AOAC), 1990. Official methods of analysis, 12th ed. AOAC International, Washington, D.C.
- Alli, I., Fairbairn, R., Baker, B.E., Garcia, G. 1983. The effects of ammonia on the fermentation of chopped sugarcane. Anim. Feed Sci. Technol. 9, 291-299.
- Carvalho, B.F., Ávila, C.L.S.; Pinto, J.C., Neri, J., Schwan, R.F. 2014. Microbiological and chemical profile of sugar cane silage fermentation inoculated with wild strains of lactic acid bacteria. Anim. Feed Sci. Technol. 195, 1-13.
- Costa, R.F., Pires, D.A.A., Moura, M.M.A., Sales, E.C.J., Rodrigues, J.A.S., Rigueira, J.P.S. 2016. Agronomic characteristics of sorghum genotypes and nutritional values of silage. Acta Sci. Anim. Sci. 38, 127-133.
- Crowley, S., Mahony, J., Sinderen, D.V. 2013. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. Trends Food Sci. Technol. 33, 93-109.
- Çürek, M., Özen, N. 2004. Feed value of cactus and cactus silage. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 28, 633- 639.



- Felkai-Haddache, L., Remini, H., Dulong, V., Mamou-Belhabib, K., Picton, L., Madani, K., Rihouey, C. 2015. Conventional and microwave-assisted extraction of mucilage from *Opuntia ficus-indica* cladodes: physico-chemical and rheological properties. Food Bioprocess Tech. 9, 481–492.
- Filya, I., Sucu, E. 2010. The effects of lactic acid bacteria on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. Grass Forage Sci. 65, 446-455.
- Gusha, J., Halimani, T.E., Ngongoni, N. T., Ncube, S. 2015. Effect of feeding cactus-legume silages on nitrogen retention, digestibility and microbial protein synthesis in goats. Feed Sci. Technol. 206, 1–7.
- Gusha, J., Katsande, S., Zvinorova, P.I., Ncube, S.L. 2013. The nutritional composition and acceptability of cacti (*Opuntia ficus indica*)-legume mixed silage. Online j. Anim. Feed Res. 3, 116–120.
- Isaac, A.A. 2016. Overview of Cactus (*Opuntia Ficus-Indica* (L): A Myriad of Alternatives. Stud Ethno-Med. 10, 195-205.
- Kalegowda, P., Chauhan, A.S., Urs, S.M.N. 2016. *Opuntia dillenii* (Ker-Gawl) Haw cladode mucilage: Physico-chemical, rheological and functional behavior. Carbohydr Polym. 157, 1057-1064.
- Ke, W., Ding, W., Xu, D., Shah, M. N., Zhang, P., Guo, X. 2018. Influences of addition of malic acid or citric acid, *Lactobacillus plantarum* and their mixtures on fermentation quality, proteolysis and fatty acid composition of ensiled alfalfa. Arch Anim Nutr. 72, 492-502.
- Kleinschmit, D.H., Kung L. Jr. 2006. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage. J. Dairy Sci. 89, 3999–4004.
- Kung JR., L., Shaver, R.D., Grant, R.J. Schmidt, R.J. 2018. Silage review: interpretation of chemical, microbial and organoleptic components of silages. J. Dairy Sci., 101, 4020-4033.
- Kung JR., L., Ranjit, N.K. 2001. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. J. Dairy Sci. 84, 1149-1155.
- Li, X., Tian, J., Zhang, Q., Jiang, Y., J. Hou, J., Z. Wu, Z., Yu, Z., 2018. Effects of applying *Lactobacillus plantarum* and Chinese gallnut tannin on the dynamics of protein degradation and proteases activity in alfalfa silage. Grass Forage Sci. 1-12.
- Li, D., Ni, K., Pang, H., Wang, Y., Cai, Y., Jin, Q. 2015. Identification and antimicrobial activity detection of lactic acid bacteria isolated from corn stover silage. Asian-Australas J Anim Sci. 28, 620-63.

- Macêdo, A.J.S., Santos, E.M., Araújo, G.G.L., Edvan, R.L., Oliveira, J.S., Perazzo, A.F., Sá, W.C.C.S., Pereira, D.M. 2018. Silages in the form of diet based on spineless cactus and buffelgrass. *Afr. J. Range Forage Sci.* 1–9.
- Monrroy, M., García, E., Ríos, K., García, J.R. 2017. Extraction and physicochemical characterization of mucilage from *Opuntia cochenillifera* (L.) Miller. *J. Chem.* 1-9.
- Moon, N.J., Ely, L., Sudweeks, E.M. 1981. Fermentation of wheat, corn and alfalfa silages inoculated with *Lactobacillus acidophilus* and *Candida sp.* at ensiling. *J. Dairy Sci.* 64, 807--813.
- Muck, R.E. 2010. Silage microbiology and its control through additives. *R. Bras. Zootec.* 39, 183-191.
- Mertens, D.R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. *J. AOAC Internat.* 85, 1217-1240.
- Ndagano, D., Lamoureux, T., Dortu, C., Vandermoten, S., Thonart, P. 2011. Antifungal activity of 2 lactic acid bacteria of the *Weissella* genus isolated from food. *J. Food Sci.* 76, 305–311.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375-380.
- Pedroso A.F., Nussio L.G., Paziani S.F., Loures D.R.S., Igarasi M.S., Coelho R.M., Packer I.H., Hori I.J., Gomes L.H. 2005. Fermentation and epiphytic microflora dynamics in sugar cane silage. *Sci. Agri.* 62, 427-432.
- Petera, B., Delattre, C., Pierre, G., Wadouachi, A., Elboutachfai, R., Engel, E., Poughon, L., Michaud, P., Fenoradosoa, T.A. 2015. Characterization of arabinogalactan-rich mucilage from *Cereus triangularis* cladodes. *Carbohydr Polym.* 127, 372-380.
- Pholsen, S., Khota, W., Pang, H., Higgs, D., Cai, Y. 2016. Characterization and application of lactic acid bacteria for tropical silage preparation. *Animal Sci. J.* 8710, 1202-1211.
- Playne, M., P. McDonald. 1966. The buffering constituents of herbage and of silage. *J. Sci. Food Agric.* 17, 264-268.
- Reina Asa, T.A., Uehara, A., Shinzato, I., Toride, Y., Usui, N., Hirakawa, K., Takahashi J. 2010. Effects of protease-resistant antimicrobial substances produced by lactic acid bacteria on rumen methanogenesis. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 23. 700-707.
- Rodrigues, A. M.; Pitacas, F.I.; Reis, C. M. G.; Blasco, M. 2016. Nutritional value of *Opuntia ficus-indica* cladodes from Portuguese ecotypes. *Bulg. J. Agric. Sci.* 22, 40-45.

- Santos, A.O, Ávila, C.L.S, Pinto, J.C., Carvalho, B.F., Dias, D.R., Schwan, R.F. 2015. Fermentative profile and bacterial diversity of corn silages inoculated with new tropical lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 120, 266–279.
- Schmidt, R.J., W. Hu, J., Mills, L. Kung. 2009. The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* 92, 5005–5010.
- Shah, A.A., Xianjun, Y., Zhihao, D., Junfeng, L., Sao, T. 2017. Microbiological and chemical profiles of elephant grass inoculated with and without *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*. *Arch Microbiol.* 2, 311-328.
- Sifeeldein, A., Yuan, Z., Dong, Z., Li, J., Youns, H., Shao, T. 2018. Characterization and identification of lactic acid bacteria by 16S rRNA gene sequence and their effect on the fermentation quality of Elephant Grass (*Pennisetum purpureum*) Silage. *Kafkas. Univ. Vet. Fak. Derg.* 24, 123-130.
- Toit, A.D., Wit, M., Hugo, A. 2018. Cultivar and harvest month influence the nutrient content of *Opuntia spp.* cactus pear cladode mucilage extracts. *Molecules.* 23, 916.
- Xu, Z., He, H., Zhang, S., Kong, J. 2017. Effects of inoculants *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus parafarraginis* on the fermentation characteristics and microbial communities of corn stover silage. *Sci. Rep.* 7, 13614.
- Weirich, D.T., Neres, M.A., Hunoff, C.A., Ströher, S.M., Nath, C.D., Sunahara, S.M. M., Sarto, J.R.W., Oldoni, T. 2018. Microbiological profile and aerobic stability of tifton 85 bermudagrass silage with or without vacuum and microbial inoculants. *Bioscience j.* 34,151-161.
- Zanine, A.M., Santos, E.M., Dórea, J.R.R., Dantas, P.A.S., Silva, T.C., Pereira, O.G. 2010. Evaluation of elephant grass silage with the addition of cassava scrapings. *R. Bras. Zootec.* 39, 2611-2616.

Tabela 1.Morfologia e características bioquímicas dos isolados da planta e da silagem de palma forrageira.

<b>Isolado</b>	<b>Forma</b>	<b>Coloração de Gram</b>	<b>Atividade de Catalase</b>
cf0_1	Bacillus	+	-
cf0_2	Bacillus	+	-
cf0_3	Bacillus	+	-
cf0_4	Bacillus	+	-
cf0_5	Bacillus	+	-
cf0_6	Bacillus	+	-
cf0_7	Bacillus	+	-
cf0_8	Bacillus	+	-
cf0_9	Bacillus	+	-
cf0_10	Bacillus	+	-
cf0_11	Bacillus	+	-
cf0_12	Bacillus	+	-
cf0_13	Bacillus	+	-
cf0_14	Bacillus	+	-

cf0_15	Bacillus	+	-
cf0_16	Bacillus	+	-
cf0_17	Bacillus	+	-
cf0_18	Bacillus	+	-
cf0_19	Nd <sup>1</sup>	+	-
cf0_20	Bacillus	+	-
cs60_21	Bacillus	+	-
cs60_22	Bacillus	+	-
cs60_23	Bacillus	+	-
cs60_24	Bacillus	+	-
cs60_25	Bacillus	+	-
cs60_26	Bacillus	+	-
cs60_27	Bacillus	+	-
cs60_28	Bacillus	+	-
cs60_29	Bacillus	+	-
cs60_30	Bacillus	+	-
cs60_31	Bacillus	+	-
cs60_32	Bacillus	+	-
cs60_33	Bacillus	+	-
cs60_34	Bacillus	+	-
cs60_35	Bacillus	+	-
cs60_36	Bacillus	+	-
cs60_37	Bacillus	+	-
cs60_38	Bacillus	+	-
cs60_39	Bacillus	+	-
cs60_40	Bacillus	+	-

Nd, não detectado; cf, forragem de palma; cs, silagem de palma

Tabela 2. Composição química e populações microbianas em palma forrageira antes da ensilagem.

Item	
Composição química (g/kg de DM)	
Matéria Seca (g/kg de matéria fresca)	206.35
Matéria Mineral	83.48
Proteína bruta	66.16
Extrato etéreo	34.66
Fibra detergente neutro	117.94
Carboidratos Solúveis em Água	125.0
Microrganismos (log <sub>10</sub> ufc <sup>1</sup> por g de matéria fresca)	
Bactérias do ácido láctico	6.64
Leveduras e Mofos	5.47
Enterobactérias	5.76

<sup>1</sup> unidades formadoras de colônias.

Tabela 3. Conteúdo (mg / dm<sup>3</sup>) de ácido láctico (AL), ácido acético (AA), relação ácido láctico / ácido acético (AL/AA) e pH por estirpes de BAL em caldo MRS.

<b>Estirpe BAL</b>	<b>AL</b>	<b>AA</b>	<b>AL / AA</b>	<b>pH<sup>3</sup></b>
cf0_1 <sup>1</sup>	206.40	570.83	0.36	4.79
cf0_2 <sup>1</sup>	885.17	594.60	1.49	4.84
cf0_3 <sup>1</sup>	1180.99	451.38	2.61	4.89
cf0_4 <sup>1</sup>	1171.44	355.26	3.29	5.24
cf0_5 <sup>1</sup>	1097.54	136.98	8.01	4.59
cf0_6	1272.38	267.77	4.75	5.06
cf0_7 <sup>1</sup>	935.49	46.38	20.17	4.85
cf0_8	536.22	192.13	2.79	4.94
cf0_9	186.98	134.62	1.39	4.94
cf0_10 <sup>1</sup>	2042.05	240.50	8.49	5.14
cf0_11	1184.32	207.69	5.70	4.97
cf0_12	906.43	212.87	4.26	5.02
cf0_13	1027.02	90.84	11.30	5.01
cf0_14	446.09	189.35	2.35	4.97
cf0_15 <sup>1</sup>	947.22	532.96	1.78	7.82
cf0_16	1064.66	100.36	10.61	4.47
cf0_17	1074.73	158.79	6.77	4.81
cf0_18 <sup>2</sup>	1042.32	73.63	14.16	4.44

cf0_19 <sup>1</sup>	960.81	133.04	7.22	4.65
cf0_20	421.38	207.11	2.03	4.95
cs60_21 <sup>2</sup>	1604.99	82.29	19.50	4.35
cs60_22 <sup>2</sup>	1316.39	69.75	18.87	4.36
cs60_23 <sup>2</sup>	1450.64	64.71	22.42	4.35
cs60_24 <sup>2</sup>	1672.25	77.37	21.61	4.35
cs60_25	1497.57	49.30	30.37	4.43
cs60_26 <sup>1</sup>	1317.07	485.03	2.71	4.37
cs60_27	1636.46	93.03	17.59	4.31
cs60_28	298.56	55.86	5.34	4.63
cs60_29	1866.62	114.57	16.29	4.44
cs60_30 <sup>2</sup>	1511.13	71.04	21.27	4.34
cs60_31 <sup>2</sup>	1419.78	67.24	21.11	4.36
cs60_32 <sup>2</sup>	1296.65	110.75	11.71	4.39
cs60_33	1282.88	97.52	13.15	4.38
cs60_34	1365.88	112.42	12.15	4.37
cs60_35	1423.10	95.40	14.91	4.38
cs60_36	1401.22	89.56	15.64	4.37
cs60_37 <sup>2</sup>	1680.59	72.73	23.11	4.41
cs60_38 <sup>2</sup>	1409.94	73.71	19.13	4.39
cs60_39 <sup>2</sup>	1627.51	81.25	20.03	4.36
cs60_40	1503.11	79.99	18.79	4.33

Cf = palma forrageira; cs = silagem de palma; <sup>1</sup> estirpe com maior produção de ácido láctico; <sup>2</sup> linhagens com maior produção de ácido acético; <sup>3</sup>pH= Potencial hidrogeniônico

Tabela 4. Isolados, similaridade de espécies bacterianas e código de acesso ao GenBank de BAL isolados de palma forrageira e silagens.

Isolados	Espécies	Similaridade (%)	Código de acesso GenBank <sup>1</sup>
GP1	<i>Weissella confusa</i>	99	XWEDU6KA015
GP2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96	XWK3VBWV015
GP3	<i>Weissella confusa</i>	99	XWJZWCY4014
GP4	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99	XWG4J3Y4014
GP5	<i>Weissella confusa</i>	98	XWJVYX6XD14
GP7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	XWGSB8M4015
GP10	<i>Weissella confusa</i>	97	XWG9P2BX01R
GP15	<i>Weissella paramesenteroides</i>	97	XWEKSX3M014
GP18	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	XWHHGDBV015
GP19	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	XWGDW63601R
GP21	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	XWJ8WKAV015
GP22	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	XWJ5A2F7014
GP23	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	XWJN6V6S01R
GP24	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	XWJH0MTE015
GP26	<i>Weissella cibaria</i>	97	XWGY2HDT01R
GP30	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	XWE854EZ014
GP31	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	XWJD8VB801R
GP37	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	XWHRW4FN015

GP38	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96	XWJ0PVEH014
GP39	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	XWHDNH33014

Identificação baseada no gene de ~ 1.500 pares de bases que codificam uma porção do 16S rDNA.\* As cepas com identificação de GP1 a GP19 foram isoladas de plantas. Cepas com identificação de GP21 a GP39 foram isoladas de silagens.

Tabela 5. Efeitos do inoculante microbiano nas perdas de gás e efluente e na recuperação de matéria seca da silagem de palma

	<b>Estirpes BAL</b>	<b>PG (g/kg MN)</b>	<b>PE (kg/t)</b>	<b>RMS (g/kg MV)</b>
Controle	sem inoculante	9.27 <sup>a</sup>	9.96 <sup>a</sup>	893.0 <sup>b</sup>
GP1	<i>W. confusa</i>	5.82 <sup>a</sup>	6.03 <sup>a</sup>	961.2 <sup>a</sup>
GP2	<i>L. plantarum</i>	7.72 <sup>a</sup>	10.47 <sup>a</sup>	884.9 <sup>b</sup>
GP3	<i>W. confusa</i>	5.81 <sup>a</sup>	6.16 <sup>a</sup>	939.1 <sup>a</sup>
GP5	<i>W. confusa</i>	5.92 <sup>a</sup>	3.95 <sup>a</sup>	941.0 <sup>a</sup>
GP15	<i>W. paramesenteroides</i>	6.35 <sup>a</sup>	6.31 <sup>a</sup>	959.4 <sup>a</sup>
GP21	<i>L. plantarum</i>	5.51 <sup>a</sup>	9.15 <sup>a</sup>	952.9 <sup>a</sup>
GP22	<i>L. plantarum</i>	3.66 <sup>a</sup>	4.81 <sup>a</sup>	976.9 <sup>a</sup>
GP23	<i>L. plantarum</i>	4.43 <sup>a</sup>	4.72 <sup>a</sup>	931.3 <sup>a</sup>
GP24	<i>L. plantarum</i>	3.55 <sup>a</sup>	3.99 <sup>a</sup>	973.4 <sup>a</sup>
GP31	<i>L. plantarum</i>	5.43 <sup>a</sup>	4.91 <sup>a</sup>	969.3 <sup>a</sup>
	<i>P</i> -value	0.77	0.12	<0.001
	SEM	2.15	1.80	1.44

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente. BAL, bactérias do ácido lático; PG, perdas de gás; PE, perdas de efluentes; RMS, recuperação de matéria seca; MN, matéria natural, MV, matéria fresca





Tabela 6. Efeitos do inoculante microbiano sobre as concentrações de ácido láctico (AL), ácido acético (AA), ácido propiônico (AP), ácido butírico (AB), relação ácido láctico:ácido acético (AL/AA), carboidratos solúveis em água (WSC), nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) e capacidade tampão (CT) de silagem de palma

	<b>Estirpe BAL</b>	<b>AL<sup>1</sup></b>	<b>AA<sup>1</sup></b>	<b>AP<sup>1</sup></b>	<b>AB<sup>1</sup></b>	<b>AL/AA<sup>1</sup></b>	<b>CSA<sup>1</sup></b>	<b>pH</b>	<b>N-NH<sub>3</sub>/TN<sup>2</sup></b>	<b>CT<sup>3</sup></b>
controle	sem inoculante	64,8	14,0	0,12	0,008	4,63	92,7 <sup>b</sup>	4,07	2,09 <sup>a</sup>	0,07
GP1	<i>W. Confusa</i>	58,9	11,6	0,06	0,009	5,07	123,6 <sup>a</sup>	4,19	1,77 <sup>b</sup>	0,09
GP2	<i>L. Plantarum</i>	53,1	12,6	0,09	0,008	4,21	79,1 <sup>c</sup>	4,04	1,53 <sup>b</sup>	0,09
GP3	<i>W. Confusa</i>	56,9	12,3	0,07	0,011	4,62	73,9 <sup>c</sup>	4,15	1,58 <sup>b</sup>	0,10
GP5	<i>W. Confusa</i>	53,9	10,4	0,08	0,008	5,18	48,1 <sup>d</sup>	4,03	1,90 <sup>a</sup>	0,10
GP15	<i>W. Paramesenteroides</i>	52,2	11,5	0,07	0,007	4,53	69,8 <sup>c</sup>	3,95	2,56 <sup>a</sup>	0,10
GP21	<i>L. Plantarum</i>	56,3	10,8	0,04	0,007	5,21	66,9 <sup>c</sup>	4,16	2,63 <sup>a</sup>	0,08
GP22	<i>L. Plantarum</i>	67,4	11,4	0,04	0,008	5,91	96,6 <sup>b</sup>	3,87	2,25 <sup>a</sup>	0,10
GP23	<i>L. Plantarum</i>	54,3	10,2	0,06	0,008	5,32	47,9 <sup>d</sup>	4,04	0,99 <sup>c</sup>	0,08
GP24	<i>L. Plantarum</i>	49,0	9,8	0,05	0,009	5,00	79,4 <sup>c</sup>	3,94	2,08 <sup>a</sup>	0,14
GP31	<i>L. Plantarum</i>	58,3	11,3	0,05	0,008	5,16	45,9 <sup>d</sup>	4,07	1,94 <sup>a</sup>	0,08
	<i>P-value</i>	0,55	0,27	0,32	0,06	0,15	<0,001	0,86	<0,001	0,13
	<i>EPM</i>	0,58	0,10	0,02	0,0007	0,36	0,42	0,13	0,19	0,01

Valores em uma mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes. <sup>1</sup>= expresso em g/kg de matéria seca; <sup>2</sup> = expresso em g/kg NT= Nitrogênio total; <sup>3</sup>= expresso em mEq NaOH/ 100g de MS.

Tabela 7. Efeitos do inoculante microbiano na composição química (g / kg de MS) da silagem de palma

	<b>Estirpe BAL</b>	<b>MS</b>	<b>MM<sup>1</sup></b>	<b>PB<sup>1</sup></b>	<b>EE<sup>1</sup></b>	<b>FDN<sup>1</sup></b>
Controle	sem inoculante	194.6 <sup>a</sup>	92.1 <sup>a</sup>	67.2 <sup>a</sup>	57.7 <sup>c</sup>	114.54 <sup>a</sup>
GP1	<i>W. Confusa</i>	205.5 <sup>a</sup>	83.2 <sup>a</sup>	63.1 <sup>a</sup>	47.0 <sup>d</sup>	104.80 <sup>a</sup>
GP2	<i>L. Plantarum</i>	201.0 <sup>a</sup>	84.3 <sup>a</sup>	67.2 <sup>a</sup>	79.7 <sup>a</sup>	126.78 <sup>a</sup>
GP3	<i>W. Confusa</i>	203.5 <sup>a</sup>	87.3 <sup>a</sup>	62.0 <sup>a</sup>	65.8 <sup>b</sup>	121.57 <sup>a</sup>
GP5	<i>W. Confusa</i>	202.9 <sup>a</sup>	80.1 <sup>a</sup>	65.0 <sup>a</sup>	70.9 <sup>b</sup>	124.65 <sup>a</sup>
GP15	<i>W. paramesenteroides</i>	207.7 <sup>a</sup>	78.8 <sup>a</sup>	56.7 <sup>b</sup>	77.0 <sup>a</sup>	116.12 <sup>a</sup>
GP21	<i>L. Plantarum</i>	205.0 <sup>a</sup>	86.7 <sup>a</sup>	49.6 <sup>b</sup>	84.0 <sup>a</sup>	124.87 <sup>a</sup>
GP22	<i>L. Plantarum</i>	207.2 <sup>a</sup>	86.6 <sup>a</sup>	49.7 <sup>b</sup>	68.7 <sup>b</sup>	121.64 <sup>a</sup>
GP23	<i>L. Plantarum</i>	223.8 <sup>a</sup>	82.3 <sup>a</sup>	55.7 <sup>b</sup>	65.1 <sup>b</sup>	124.78 <sup>a</sup>
GP24	<i>L. Plantarum</i>	209.1 <sup>a</sup>	86.3 <sup>a</sup>	54.7 <sup>b</sup>	48.3 <sup>d</sup>	107.57 <sup>a</sup>
GP31	<i>L. Plantarum</i>	211.8 <sup>a</sup>	80.0 <sup>a</sup>	59.8 <sup>a</sup>	33.5 <sup>e</sup>	105.75 <sup>a</sup>
<i>P</i> -value		0.41	0.40	0.03	<0.001	0.87
SEM		0.69	0.25	0.30	0.20	10.45

Os valores em uma coluna com diferentes letras são significativamente diferentes. MS = matéria seca; MM= matéria mineral; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; NDF = fibra em detergente neutro

Tabela 8. Efeitos do inoculante microbiano em populações microbianas (log cfu/g silagem) e estabilidade aeróbia da silagem de palma

	<b>Estirpe BAL</b>	<b>BAL</b>	<b>Enterobactérias</b>	<b>Levedura e mofos</b>	<b>Estabilidade aeróbia (h)</b>
Controle	sem inoculante	4.50 <sup>b</sup>	<2.00	<2.00	> 96
GP1	<i>W. Confusa</i>	2.51 <sup>c</sup>	<2.00	<2.00	> 96
GP2	<i>L. Plantarum</i>	4.39 <sup>b</sup>	<2.00	<2.00	> 96
GP3	<i>W. Confusa</i>	4.56 <sup>b</sup>	<2.00	<2.00	> 96
GP5	<i>W. Confusa</i>	3.66 <sup>c</sup>	<2.00	<2.00	> 96
GP15	<i>W. paramesenteroides</i>	5.57 <sup>a</sup>	<2.00	<2.00	> 96
GP21	<i>L. Plantarum</i>	3.71 <sup>c</sup>	<2.00	<2.00	> 96
GP22	<i>L. Plantarum</i>	2.85 <sup>d</sup>	<2.00	<2.00	> 96
GP23	<i>L. Plantarum</i>	4.38 <sup>b</sup>	<2.00	<2.00	> 96
GP24	<i>L. Plantarum</i>	3.63 <sup>c</sup>	<2.00	<2.00	> 96
GP31	<i>L. Plantarum</i>	3.71 <sup>c</sup>	<2.00	<2.00	> 96
<i>P</i> -value		<0.001	-	-	-
SEM		0.08	-	-	-

Os valores na coluna com letras diferentes são significativamente diferentes.

## Capítulo II

---

### **Avaliação da palma *in natura* e silagem de palma forrageira na alimentação de ovinos**

## Avaliação da palma *in natura* e silagem de palma forrageira na alimentação de ovinos

### RESUMO

O experimento foi conduzido com o objetivo de comparar a palma *in natura* e ensilada com e sem inoculante microbiano na dieta de ovinos, por meio da avaliação do consumo, digestibilidade de nutrientes, balanço nitrogenado e síntese de proteína microbiana, bem como contagem de enterobactérias fecais. Foram utilizados 20 ovinos sem padrão racial definido, não-castrados com, aproximadamente, 6 meses de idade e peso inicial médio de  $23,48 \pm 2,40$  kg, os quais foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (Palma forrageira *in natura* processada duas vezes ao dia, na hora do fornecimento (PF1); palma forrageira *in natura* processada uma única vez pela manhã e fornecida duas vezes ao dia (PF2); silagem de palma sem inoculante (SPF); silagem de palma com inoculante microbiano (SPFI) e cinco repetições por tratamento. O período experimental teve duração de 21 dias. A utilização da palma forrageira na forma de silagem (SFP e SPFI) resultou em maiores ( $P < 0,05$ ) consumos de matéria seca, matéria orgânica, fibra em detergente neutro, extrato etéreo, carboidratos não fibrosos e nutrientes digestíveis totais. Quanto aos coeficientes de digestibilidade, o uso de SFP e SPFI também promoveram maior digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica, bem como dos nutrientes digestíveis totais. Observou-se também menores contagens de enterobactérias fecais para os animais alimentados com silagem de palma com e sem inoculante. Por outro lado, não foi verificado efeito ( $P > 0,05$ ) das dietas sobre o balanço de nitrogênio, eficiência microbiana, perdas do nitrogênio urinário, fecal e eficiência microbiana. A utilização da silagem de palma forrageira promove redução na contagem de enterobactérias, melhorando o consumo e digestibilidade dos nutrientes.

**Palavras-chave:** cactácea, ensilagem, inoculante microbiano, ruminante

## **Evaluation of spineless-cactus silage and fresh spineless cactus food in sheep**

### **ABSTRACT**

The experiment was conducted with the objective of comparing the in natura and ensiled palm with and without microbial inoculant in the sheep diet, by means of the evaluation of the consumption, nutrient digestibility, nitrogen balance and microbial protein synthesis, as well as count of fecal enterobacteria . Twenty females with no defined breeding pattern were used, which were not castrated at approximately 6 months of age and had a mean initial weight of  $23.48 \pm 2.40$  kg, which were distributed in a completely randomized design with four treatments (forage palm in (PF1), unfiltered palm silage (SPF), palm silage with microbial inoculant (PF1), fresh forage palm processed once a day, (SPFI) and five replicates per treatment, the experimental period lasted for 21 days The use of forage palm in the form of silage (SFP and SPFI) resulted in higher ( $P < 0.05$ ) intakes of dry matter, organic matter, fiber in neutral detergent, ethereal extract, non-fibrous carbohydrates and total digestible nutrients. As for the digestibility coefficients, the use of SFP and SPFI also promoted greater digestibility of dry matter, matter organic matter, as well as total digestible nutrients. There were also lower counts of fecal enterobacteria for the animals fed with palm silage with and without inoculant. On the other hand, no effect ( $P > 0.05$ ) of diets on nitrogen balance, microbial efficiency, losses of urinary nitrogen, fecal and microbial efficiency were observed. The use of forage palm silage promotes a reduction in the enterobacteria count, improving nutrient intake and digestibility.

**Keywords:** Cactaceous, Ensiling, Microbial inoculant, Ruminant

### **Introdução**

A produção de ruminantes em regiões semiáridas é afetada pelas oscilações climáticas ao longo do ano, sendo necessário a utilização de plantas persistentes ao déficit hídrico, como é o caso da palma forrageira. Esta espécie apresenta elevados teores de água e carboidratos não fibrosos. Com isso, o produtor pode substituir parcialmente o concentrado energético por esta cactácea (Aguilar-Yáñez et al., 2011; Costa et al., 2012; Rodrigues et al., 2016; Herrera et al., 2017), resultando em diminuição dos custos de produção, principalmente nos confinamentos.

A palma forrageira apresenta baixos teores de matéria seca (MS) (8,32- 10,8%) e PB (5,42-7,54%), porém com elevados teores de carboidratos não fibrosos (CNF) (46,00- 47,37%) e minerais (Costa et al., 2012; Lopes et al., 2017). Dentre os minerais, são constatados elevados teores de cálcio (13-40 g/kg de MS) e baixo teor de fósforo (0,99- 2,79 g/kg de MS) em sua composição, proporcionando uma elevada relação cálcio:fósforo, podendo acarretar problemas renais e redução no consumo de matéria seca e nutrientes (Vazquez-Mendoza et al., 2016).

Quando utilizada na forma de silagem, a palma forrageira pode proporcionar algumas vantagens agrônomicas e operacionais, uma vez que a ensilagem de palma, permite a colheita de todo o palmal, uniformizando e aumentando a capacidade de rebrotação e, conseqüentemente, a produtividade, além de diminuir a mão-de-obra com colheita e fornecimento periódico, ao longo do período de estiagem.

Estudos promissores vem sendo conduzidos no Brasil avaliando a utilização da palma forrageira, na forma de ração completa ou ensilada com gramíneas (Macêdo et al., 2017; Macêdo et al., 2018; Nobre et al., 2018). Alguns autores também verificaram que quando colhida a partir do segundo ano de rebrotação, em função da presença da mucilagem, que reduz as perdas por efluente e da sua quantidade de carboidratos solúveis, tem sido possível obter silagens de palma bem fermentadas (Mokoboki et al., 2016; Monrroy et al., 2017; Sá et al., 2018).

No entanto, um problema recorrente observado nos confinamentos, principalmente de caprinos e ovinos jovens, tem sido a ocorrência de diarreias associadas ao manejo alimentar. Alguns autores relacionam esse distúrbio a baixa quantidade de fibra em detergente neutro das dietas (Gebremariam et al., 2006; Costa et al., 2012; Pinho et al., 2018). Outros autores, consideram que pode haver diarreia em função da presença de oxalato na palma forrageira. No entanto, alguns trabalhos apontam para o fato de que quando compoendo uma dieta total, a quantidade de oxalato não seria suficiente para acarretar diarreias nos animais (Gouveia et al., 2015).

Assim, é hipotetizado que a presença de microrganismos patogênicos, tais como algumas enterobactérias pode ser uma das causas desses distúrbios, o que poderia acarretar



efeitos negativos no desempenho dos animais. Callaway et al. (2010) demonstrou que dietas com alto grão permitiu o aparecimento de espécies patogênicas de *Escherichia coli*, no rúmen e fezes de bezerros, o que resultou em diarreia e queda do desempenho dos animais.

A palma forrageira apresenta elevada quantidade de carboidratos não fibrosos, semelhantemente aos grãos energéticos, bem como alta umidade, proporcionando condições favoráveis ao crescimento das enterobactérias quando processada e fornecida no cocho. Isso pode representar uma condição ainda mais comprometedora quando alguns produtores processam a planta para compor as dietas uma única vez ao dia, para fornecer em todos os horários. Esse manejo pode resultar em estímulo do crescimento de várias enterobactérias, principalmente quando a higiene não é adequada, muitas das quais podem ser patogênicas e resultar em diarreias, comprometendo assim o consumo e o aproveitamento dos nutrientes pelos ovinos confinados.

A atividade das enterobactérias poderia ser mitigada com o manejo adequado de fornecimento de alimento, pois é sabido que nenhuma enterobactéria é observado em ambientes com pH em torno de 4,0 (Muck, 2010; Zheng et al., 2017; Rosa et al., 2018), valor que tem sido encontrado em silagens de palma. Dessa forma, seria possível evitar a inoculação desses microrganismos no rúmen dos ovinos alimentados com esta silagem. Além disso, o processo de ensilagem promove uma pequena redução do teor de carboidratos não fibrosos, o que poderia reduzir os riscos de acidose ruminal, prevenindo a proliferação de enterobactérias oportunistas. Portanto, também é assumido que o uso de inoculante microbiano poderia incrementar os efeitos benéficos da ensilagem, principalmente ao se utilizar uma estirpe de bactéria láctica isolada da própria palma forrageira.

O presente estudo foi realizado para testar a hipótese de que os elevados teores de carboidratos não-fibrosos e umidade da palma forrageira triturada com diferentes tempos de fermentação promove a proliferação de bactérias patogênicas, causando diarreia. Portanto, a utilização da silagem de palma forrageira na dieta de ovinos podem indicar possíveis efeitos benéficos sobre o consumo e a digestibilidade dos nutrientes, evitando distúrbios digestivos causados pelas bactérias patogênicas em comparação com a palma *in natura*.

Assim, objetivou-se avaliar o efeito da palma *in natura* e silagem de palma com e sem inoculante microbiano quando fornecidos na dieta de ovinos sem padrão racial definido (SPRD), por meio da avaliação do consumo, digestibilidade de nutrientes, balanço nitrogenado e síntese de proteína microbiana, bem como contagem de enterobactéria fecal.

## **Material e Métodos**

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa para o uso de animais da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (número do protocolo N°004/2018/IPeFarM). Dessa forma, todos os procedimentos adotados seguiram os princípios éticos da experimentação animal. O experimento foi realizado entre os meses de novembro a dezembro de 2017 na Fazenda Experimental de Pendência pertencente à Empresa de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S.A (EMEPA), no município de Soledade-PB, Brasil (7°8'18" S e 36° 27' 2" W; 534 m de altitude).

Foram utilizados 20 ovinos SPRD, não-castrados, com aproximadamente seis meses de idade e peso inicial médio de  $23,48 \pm 2,40$  kg. Os animais foram alojados em baias individuais contendo bebedouro e comedouro, localizado em um galpão de alvenaria com piso de concreto. Água e o suplemento mineral foram fornecidos a vontade. O experimento teve duração de 31 dias, e foi precedido por 10 dias de adaptação dos animais ao ambiente, ao manejo e às dietas, e 21 dias destinados para a coleta de dados. Durante o período de adaptação todos os animais foram vacinados contra Clostridiose e tratados contra endo e ectoparasitas. Para manutenção da saúde dos animais todos os dias as instalações passaram por um processo de limpeza para remoção dos dejetos, sendo os mesmos armazenados em esterqueira.

Os pesos dos animais foram utilizados com o objetivo de calcular o ofertado e ser procedido o ajuste das sobras. A palma utilizada na ensilagem e fornecida *in natura* foi proveniente da variedade gigante (*Opuntia ficus-indica*) colhida na Fazenda Experimental de Pendência pertencente à Empresa de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S.A (EMEPA), situada no município de Soledade – PB, Brasil. A planta estava com idade de rebrotação de dois anos, colhendo-se todos os cladódios, com exceção do cladódio primário de cada planta.

Para a confecção da silagem, as plantas foram processadas em uma fatiadora com sistemas de navalhas, que permite processar os cladódios em cubos de 4 cm<sup>2</sup>. Em seguida, as plantas foram pesadas de acordo com cada tratamento e, posteriormente, a massa úmida ensilada em sacos experimentais com 25 kg de massa fresca por saco.

O inoculante utilizado na ensilagem consistiu de 1 cepa heterofermentativa facultativa (*Lactobacillus Plantarum*) e 1 heterofermentativas obrigatória (*Weissella Confusa*), escolhidas com base no perfil fermentativo do experimento anterior com palma forrageira. Dessa forma, os inoculantes foram anteriormente reativados em 10 mL de caldo MRS por 24 horas, a 30°C conforme metodologia descrita por Ávila et al. (2009). Foram utilizados 2,49 mL de caldo MRS, diluídos em 600 mL de água destilada estéril e borrifados em 25 kg da massa no momento da ensilagem, com o objetivo de se aplicar  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colônia por grama de forragem. Com relação à silagem que não continha o inoculante, foi aplicada a mesma

quantidade de água destilada no momento da ensilagem. Os silos foram abertos após o período de armazenamento de 30 dias.

Os ovinos foram alimentados com dietas compostas de palma forrageira *in natura*, silagem de palma com e sem inoculante, feno de Tifton-85, farelo de milho, farelo de soja, ureia, suplemento mineral, cloreto e sulfato de amônia, com uma relação concentrado:volumoso de 35:65 (com base na matéria seca). A fração volumosa foi composta de 4,4% de feno de tifton e 95,6% de palma *in natura* ou ensilada.

As dietas foram formuladas de modo a serem isonitrogenadas (10% de proteína bruta) permitindo um ganho médio diário de 150 gramas, de acordo com *National Research Council* (NRC, 2007).

A avaliação da composição bromatológica dos ingredientes, sobras e fezes coletados durante o período experimental foi realizada no Laboratório de Análise de Alimentos e Nutrição Animal (LAANA) do Centro de Ciências Agrárias pertencente a Universidade Federal da Paraíba (CCA/UFPB), após secagem das amostras em estufa de 55° C por período de 72 horas e moagem das mesmas em moinho do tipo Willey utilizando-se peneira de 1 mm.

A determinação dos teores de matéria seca (MS) foi realizada segundo método INCT-CA G-003/1), matéria mineral (MM - método INCT-CA M-001-1), proteína bruta (PB - método INCT-CA M-001/1), extrato etéreo (EE - método INCT-CA G-004/1). Para as análises de determinação da fibra em detergente neutro (FDN) utilizou-se o método (FDN- INCT-CA F-002/1) e a fibra em detergente ácido (FDA - INCT-CA F-004/1). A celulose e lignina foram determinadas por hidrólise ácida (método INCT-CA F-005/1), (INCT-CA F-005/1), proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN - método INCT-CA N-004/1) cinza insolúvel em detergente neutro (CIDN- método INCT-CA M-002/1), proteína insolúvel em detergente ácido (PIDA- método INCT-CA N-005/1), conforme metodologias descritas por Detmann et al. (2012) (Tabelas 1e 2).

A concentração de fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteínas (FDNcp) foi determinada pela equação:

$$\%FDNcp_{MS} = \%FDN - (\%PIDN_{MS} + \%CIDN_{MS}).$$

Os teores de hemicelulose (HEM) foi calculado a partir da subtração do FDNcp pela FDAp. A concentração dos carboidratos não-fibrosos (CNF) foi obtida pela equação, conforme proposto por Detmann et al. (2012):

$$CNF = 100 - (\%PB + \%FDNcp + EE + MM)$$

A concentração de CNF nas dietas foi estimada pela equação descrito por Hall (1998), como segue:

$$\text{NFC} = 100 - [(\% \text{ PB} - \% \text{PB derivada da uréia} + \% \text{ ureia}) + \% \text{ NDFap} + \% \text{ EE} + \text{MM}].$$

Adicionalmente, o pH e o teor de nitrogênio amoniacal das silagens foram medida de acordo com Bolsen et al. (1992) e os níveis de ácido láctico e acético na silagem foi determinada conforme proposto por Ranjit e Kung Jr. (2001). Os seguintes valores foram observados nas silagens não inoculadas: pH: 4,1; nitrogênio amoniacal: 0,9% do total de N; ácido láctico: 50 g / kg de DM; e ácido acético: 28 g / kg de MS. Para o silagens inoculadas, os seguintes resultados foram obtidos: pH: 4,0; nitrogênio amoniacal: 0,8% do total de N; ácido láctico: 58 g / kg de MS; e ácido acético: 23 g / kg de MS.

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia (às 08:00 e 16:00 horas) em porções iguais, de modo a garantir, aproximadamente, 10% de sobras. Os alimentos, sobras e fezes foram coletados nos 16º, 17º e 18º dias do período experimental.

A coleta das fezes foi realizada direto da ampola retal dos animais, para determinação da digestibilidade dos nutrientes. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até a realização das análises laboratoriais. As amostras foram homogeneizadas e feitas uma amostra composta por animal. Em seguida, esse material foi colocado em estufa de circulação forçada com temperatura de 55°C, por 72 horas, logo após esse período esse material foi triturados em moinho tipo Willey, com peneira de crivo de 1,0 mm, sendo armazenados em recipientes com tampa até a realização das análises laboratoriais.

Foram incubados amostras de sobras, fezes e alimentos em um bovino fistulado por 264 horas. Foram utilizados sacos (TNT – 12,0 × 8,0 cm), em triplicata contendo aproximadamente 4 gramas do material, com partículas de 2,0 mm (Casalli et al., 2008). Em seguida, as amostras foram pesadas para obtenção da MS fecal (PMSF). Sequencialmente foram realizadas as análise da fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) segundo a metodologia descrita por Detmann et al. (2012).

A produção de matéria seca fecal foi determinada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{PMSF} = \text{consumo do indicador (kg)} / \text{concentração do indicador nas fezes (\%)}.$$

A partir PMSF, foram determinados os coeficientes de digestibilidade (CD) de MS, MO, PB e FDN, os quais foram calculados utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{CD} = [(\text{g de nutriente consumido} - \text{g de nutriente nas fezes}) / (\text{g de nutriente consumido})] \times 100.$$

O consumo dos nutrientes digestíveis totais (NDT) foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{NDT (\%)} = \text{PBd} + \text{FDNcpd} + \text{CNFd} + \text{EEd} * 2,25.$$

Em que: Proteína bruta digestível (PBd); Fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína digestível (FDNcpd); Carboidrato não fibroso digestível (CNFd); Extrato etéreo digestível (EEd).

Foram coletadas amostras *spot* da urina dos animais no 21º dia do período experimental quatro horas após a primeira alimentação, durante micção espontânea. Sequencialmente, a urina foi filtrada e alíquotas de 10 mL foram retiradas e diluídas imediatamente em 40 mL de ácido sulfúrico a 0,036N (Valadares et al., 1999), evitando destruição bacteriana dos derivados de purinas e a precipitação do ácido úrico, e armazenadas a -15 °C em potes plásticos identificadas para posteriores análises de creatinina, derivados de purina e nitrogênio total.

A excreção diária de creatinina (mg/kg de PC) foi determinada pela multiplicação da concentração de creatinina pelo peso corporal médio de cada ovino, dividido pela concentração de creatinina (mg/L), como demonstrado a seguir:

$$\text{EDC} = \text{CCT (mg/L)} \times \text{VU (L)} / \text{PC (kg)}$$

Onde: EDC = excreção diária de creatinina (mg/L) (coleta total); VU = o volume urinário; PC = peso corporal do animal (kg).

Foi considerado que cada animal excreta 17,05 mg de creatinina por kg de peso corporal (Pereira, 2012) e, a partir da concentração de creatinina, na amostra *spot* da urina, foi calculado o volume diário excretado como demonstrado a seguir:

$$\text{VU (L)} = \text{EDC} / \text{Ccspot}$$

Para determinação do balanço de compostos nitrogenados (BN), foi obtido a diferença entre o total de nitrogênio ingerido (N-total) e o total de nitrogênio excretado nas fezes (N-fezes), e na urina (N-urina). A determinação do nitrogênio total nas fezes e na urina foi feita segundo metodologia descrita pela AOAC (1990).

Os teores urinários de alantoína, xantina e hipoxantina foram determinados segundo Chen & Gomes (1992). As concentrações de ácido úrico e ureia na urina foram determinadas utilizando-se *kits* comerciais (Bioclin®).

Para determinação da excreção total dos derivados de purina, realizou-se a soma da alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina. A quantidade de purinas microbianas absorvidas (X, mmol/dia) foi estimada a partir da excreção de derivados de purinas totais (Y, mmol/dia), por meio das equações propostas por Chen & Gomes (1992), para ovinos:

$$Y = 0,84X + (0,150 \text{ PV}^{0,75} e^{-0,25X})$$

Em que: Y é a excreção de derivados de purinas (mmol/dia); e X corresponde às purinas microbianas absorvidas (mmol/dia).

O fluxo intestinal de N microbiano (g NM/dia) foi estimado a partir da quantidade de purinas absorvidas (X, mmol/dia), segundo a equação descrita por Chen & Gomes (1992):

$$NM = X \text{ (mmol/d)} \times 70 = 0,727X \text{ 0, 83} \times 0,116 \times 1000$$

Assumindo-se a digestibilidade de 0,83 para as purinas microbianas, a relação 0,116 de N purina: N total e o conteúdo de N das purinas de 70 mg N/mmol.

A eficiência de síntese de proteína microbiana foi obtida por meio da divisão da síntese de proteína microbiana (g/dia) com o consumo de nutrientes digestíveis totais (kg/dia). Foram coletadas fezes diretamente da ampola retal, durante cinco dias consecutivos, essas amostras foram identificadas e armazenada em freezer a -20 °C para posterior análise. Foi determinado o escore fecal dos animais de acordo com a consistência, variando de 0 (consistência normal) à 4 (consistência aquosa) segundo a metodologia de Rosalinski-Moraes et al. (2012).

As Enterobactérias foram quantificadas nas amostras de fezes, palma *in natura* e ensiladas. Todas as coletas ocorreram no 14º dia do período experimental. As fezes foram colhidas diretamente da ampola retal duas horas após a alimentação matinal. No caso da planta fresca, amostras da palma processadas no manhã e tarde foram coletados antes de serem fornecidos. Todas as amostras foram armazenadas em recipientes estéreis e identificado. Estes foram transportados em sacos refrigerados para o laboratório onde a contagem microbiológica foi realizada.

Para a contagem microbiana, 10 g de amostras de alimentos e fezes foram adicionados a 90 mL de uma solução salina previamente esterilizada. Após agitação por 1 min, a solução obtida diluída em série ( $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ ), sempre realizando homogeneização prévia do material antes da coleta da alíquota. Foi utilizado o meio de cultura ágar vermelho violeta bile (VRB), e as placas foram incubadas por 24 horas à temperatura de 37°C. Foram contabilizadas as colônias nas placas que apresentaram entre 30 e 300 unidades formadoras de colônias.

As contagens de enterobactérias da planta variou de 5,1 log ufc /g e 5,8 log ufc / g para as amostras colhidas de manhã e à tarde, respectivamente. Nenhum crescimento de enterobactérias foi observado em nenhuma das silagens.

Os animais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (Palma forrageira *in natura* processada na hora do fornecimento (PF1) duas vezes ao dia; palma forrageira processada somente pela manhã (PF2); silagem de palma forrageira sem inoculante (SPF); silagem de palma forrageira com inoculante microbiano (SPFI) e cinco repetições.

O seguinte modelo foi utilizado:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_i$$

em que:

$Y_{ij}$  = valor observado da variável dependente;  $i$ ;  $\mu$  = média geral;  $T_i$  = efeito das dietas  $i$  ( $i = 1$  a 3);  $e_i$  = erro experimental associado a aplicação do tratamento  $i$  na repetição  $j$ .

Os dados foram interpretados, estatisticamente, por meio de análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## Resultados

Na Tabela 3 observa-se que os maiores ( $P < 0,05$ ) consumos de matéria seca, matéria orgânica, fibra em detergente neutro, extrato etéreo, carboidrato não fibroso e nutrientes digestíveis totais expressos em gramas/dia, foram observados para os animais alimentados com silagens, não se observando diferenças entre as silagens inoculada e sem inoculante. Por outro lado, não foi verificado efeito ( $P > 0,05$ ) das dietas nos consumos de MS e FDN, quando expressos em gramas/quilo de peso corporal. Também não se verificou efeito do manejo de fornecimento da palma *in natura* ( $P > 0,05$ ) sobre o consumo dos nutrientes.

Houve efeito das dietas ( $P < 0,05$ ) sobre os coeficientes de digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica e nutrientes digestíveis totais (tabela 4). Entretanto, não foi observado efeito nas digestibilidades de PB, FDN, EE.

Os animais alimentados com silagem de palma sem inoculante apresentaram maior digestibilidade da matéria seca (862,84 g/kg), quando comparados com a palma forrageira processada uma única vez ao dia, mas não diferiu dos demais tratamentos. O mesmo comportamento foi observado para a digestibilidade da matéria orgânica. Com relação ao NDT das dietas, os maiores valores ( $P < 0,05$ ) foram observados para os animais alimentados com silagem de palma e silagem de palma inoculada (769,93 e 748,55 g/kg, respectivamente). Porém a média observada para os animais alimentados com silagem de palma inoculada foi semelhante ( $P > 0,05$ ) aquela observada para os animais alimentados com palma forrageira processada na hora do fornecimento (724,73 g/kg).

O balanço de nitrogênio, produção e eficiência microbiana não foram influenciadas ( $P > 0,05$ ) pela inclusão da palma *in natura* ou ensilada (Tabela 5).

As perdas do nitrogênio urinário e fecal não foram afetadas ( $P > 0,05$ ) pelas dietas, o que provavelmente ocorreu devido às dietas terem sido formuladas de modo a serem isonitrogenadas (Tabela 2), permitindo que os consumos de proteína (Tabela 3) fossem

equilibrados com as excreções pelas fezes e urina dos animais (Tabela 5). A eficiência microbiana (g PB/kg NDT), também não diferiu ( $P > 0,05$ ), entre as dietas, com valores médios de 77,68.

Conforme observado no gráfico 1, o material ensilado com e sem inclusão de inoculante bacteriano apresentou as menores ( $P < 0,05$ ) contagens de enterobactérias fecais (5,48 e 5,20) em comparação as contagens de enterobactérias em ovinos alimentados com palma forrageira fornecida *in natura*, o que comprova a hipótese de redução da contaminação com enterobactérias em função da ensilagem da palma forrageira.

## Discussão

O processo de ensilagem permitiu melhorar o consumo e a digestibilidade de alguns nutrientes, o que permite ser levantadas algumas possíveis explicações. É sabido que silagens mal fermentadas podem afetar negativamente o consumo de nutrientes quando comparado com forragens *in natura*, porém no caso da silagem de palma observa-se um adequado perfil fermentativo com elevado teor de ácido láctico e reduzidos teores de ácido butírico e amônia, o que segundo Ellis et al. (2016), são os principais inibidores do consumo. Considera-se então que as silagens utilizadas não promoveram efeito negativo sobre o consumo dos nutrientes em função de suas características fermentativas.

Por outro lado, a explicação da redução do consumo de nutrientes pode se dar por características nutricionais, como elevado ou muito reduzido teor de fibra em detergente neutro ou excesso de carboidratos não fibrosos. Verificando-se a composição química das dietas, constata-se que os valores estão muito próximos entre as dietas, além das mesmas terem se mantido isonitrogenadas. Os valores de fibra em detergente neutro de todas as dietas estão acima do limite mínimo de 250 g / kg de MS sugerido por Kozloski et al. (2006) e os de carboidratos não fibrosos estão abaixo do limite máximo de 44 g / kg de MS segundo Sousa et al. (2018).

Outros autores, pressupõe-se que os maiores consumos de nutrientes das dietas com silagem se devem realmente ao controle do crescimento de microrganismos indesejáveis na planta, prevenindo assim, distúrbios ruminais e metabólicos que poderiam afetar o consumo de nutrientes (Arthur et al., 2010; Adam, K. e Brülisauer, F. 2010; Muck, 2010; Stanford et al., 2014; Dijkstra et al., 2016; Kafantaris et al., 2016). A redução na contagem de enterobactérias



pode ser um indicador de que os animais alimentados com silagens podem ter apresentado menores problemas associados ao desequilíbrio da microbiota ruminal.

De fato, os maiores problemas associados ao consumo refletem em um menor consumo de NDT dos animais alimentados com palma *in natura*, o que pressupõe que esses animais reduziram o seu desempenho se explorados em confinamento, principalmente se a quantidade de palma forrageira e, ou, concentrado, forem superiores às utilizadas neste trabalho. Além das vantagens agronômicas e operacionais relacionadas à ensilagem de palma, abre-se a possibilidade de estudos mais aprofundados sobre o microbioma ruminal e da expressão de distúrbios subclínicos que estariam afetando negativamente o consumo pelos animais alimentados com palma *in natura*.

Com relação à digestibilidade, os efeitos não são expressivos quanto aos observados sobre o consumo, o que pode ser explicado pela semelhança da composição química entre as dietas. Segundo Fotius et al. (2014), a digestibilidade tem relação direta com a taxa de passagem do alimento no rúmen e, portanto, os animais alimentados com palma *in natura*, por consumirem menor quantidade de alimentos, podem apresentar digestibilidade semelhante aos alimentados com dietas à base de silagem, devido ao maior tempo de retenção do alimento no rúmen. Por outro lado, autores como Lara et al. (2016) afirmaram que a ensilagem pode promover melhorias na digestibilidade a partir da hidrólise ácida da hemicelulose que compõe a fibra em detergente neutro.

Em resumo, considerando as maiores diferenças no consumo sem comprometimento da digestibilidade, o resultado é que animais alimentados com silagem de palma em comparação com a palma *in natura* de fato teriam como principal vantagem o maior consumo de NDT e, muito provavelmente, o aumento no desempenho.

Segundo Moreno et al. (2010), dietas formuladas adequadamente, resulta em perdas de nitrogênio semelhante. Nesse contexto, Ma et al. (2015), relataram que o sincronismo da proteína e energia, reflete em menores excreções de nitrogênio. Ainda segundo os mesmos autores, quando o nitrogênio ingerido é maior que o nitrogênio excretado nas fezes é um indicio do adequado balanceamento das dietas. De fato, a provável explicação para o balanço nitrogenado semelhante pode ter sido o sincronismo entre proteína e energia ingerida, e considerando-se que não houve alteração do balanço nitrogenado, de fato o maior consumo de energia seria o fator mais relevante para os animais alimentados com dietas a base de palma forrageira.

Outro fator que influencia o consumo dos nutrientes é a presença de enterobactéria no alimento. Essas são ativas nas primeiras horas após o corte da planta, ocasionando degradação

protéica e produzindo aminas que são compostos que afetam negativamente a aceitabilidade dos animais pelo alimento (Jobim et al., 1999). Como mencionado anteriormente, nenhuma enterobactéria foi detectada nas silagens, o que provavelmente reduziu a possibilidade de transtornos causados pela presença deste grupo microbiano.

Enterobactérias são microrganismos gram negativos, que podem produzir endotoxinas, as quais promove febre, inflamação, diarreia e coagulação sanguínea (Muck, 2010). Contudo, poucos são os estudos avaliando a presença de patógenos no alimento e sua permanência no rúmen, influenciando a saúde dos animais (Dijkstra et al., 2016; Kafantaris et al., 2016).

Entretanto, a presença das enterobactérias nas fezes é um indício de patógeno proveniente do alimento, ocasionando problemas gastrointestinais nos animais, refletindo em diminuição no consumo de matéria seca. De modo a minimizar a ação destes microrganismos deterioradores, é necessário a utilização de aditivos que melhore o perfil fermentativo da silagem (Durmaz et al., 2015). No caso específico do nosso estudo, a silagem de palma forrageira sem inoculante também exibiu um padrão de fermentação adequado, o que explica a falta de efeito nos animais. Neste caso, a inoculação deve ser justificada pela maior recuperação de MS, e estudos com silos experimentais podem ser desenvolvidos para investigar esta hipótese.

Durante a ensilagem, as bactérias lácticas produzem bacteriocinas, as quais inibe a ação de microrganismos prejudiciais a silagem e também aos microrganismos ruminais (Brashears et al., 2003; Weinberg et al., 2004; Muck, 2010; Ni et al., 2016). Considerando que a fermentação nas silagens foi principalmente láctea, pode ter havido um efeito probiótico no trato gastrointestinal dos animais, resultando em aumento do consumo.

Considerando os resultados obtidos nesta pesquisa, o principal indício de melhoria no consumo de nutrientes em ovinos alimentados com silagem de palma é o controle de potenciais patógenos que podem estar afetando o equilíbrio ruminal e de forma subclínica a saúde dos animais. Essa hipótese não vinha sendo levantada na literatura corrente, e os resultados aqui obtidos abrem o precedente para vários estudos e possíveis formas de conservar a palma forrageira isoladamente, misturas de palma forrageira e outras forrageiras adaptados ao Semiárido ou mesmo a confecção de rações à base de palma forrageira na forma de silagem, como demonstrado por Macêdo et al. (2018). Desde que se obtenha uma adequada fermentação dessas silagens, poderiam se alcançar vantagens do ponto de vista agrônômico e operacional nas fazendas, mas também uma melhoria dos resultados obtidos em confinamento além de uma redução de riscos à saúde do animal.

## Conclusão

A utilização da silagem de palma forrageira promove redução na contagem de enterobactérias, melhorando o consumo e digestibilidade dos nutrientes.

## Referências

AOAC, 1990. Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists. 18th.ed., Gaithersburg.

Ávila, C.L.S., Pinto, J.C., Figueiredo, H.C.P., Schwan, R.F. 2009. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. *Grass Forage Sci.* 64, 384-394.

Aguilar-Yáñez, M.I., Hernández-Mendo, O., Guerrero-Legarreta, I., Ramírez-Bribiesca, J.E., Aranda-Osorio, G., Crosby-Galvan, M. M. 2011. Productive response of lambs fed with fresh or dehydrated spineless cactus (*Opuntia ficus-indica* L.). *J Prof Assoc Cactus.* 13, 23-35.

Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Kalchayanand, N., Wells, J.E., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Koohmaraie, M. 2010. Evaluation of a Direct-Fed Microbial Product Effect on the Prevalence and Load of *Escherichia coli* O157:H7 in Feedlot Cattle. *J Food Prot.* 73, 366-371.

Adam, K., Brülisauer, F. 2010. The application of food safety interventions in primary production of beef and lamb: A review. *Int J Food Microbiol.* 141, 43-52.

Brashears, M.M., Galyean, M.L., Loneragan, G.H., Mann, J.E., Killinger-Mann, K. 2003. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and Performance by Beef Feedlot Cattle Given *Lactobacillus* Direct-Fed Microbials. *J Food Prot.* 66, 748-754.

Bolsen, K.K., Brent, B.E., Feyerherm, A.M., Urbano, J.E., Aimutis, W.R. 1992. Effects of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa and corn silages. *J Dairy Sci.* 75, 3066-3083.

Casalli, A.O., Detmann, E., Valadares Filho, S.C., Pereira, J.C., Henriques, L.T., Freitas, S.G., Paulino, M.F. 2008. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. *Rev. Bras. Zootec.* 37, 335- 342.

- Callaway, T.R., Dowd, S.E., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Krueger, N., Bauer, N., Kononoff, P.J., Nisbet, D.J. 2010. Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed different levels of dried distillers grains plus solubles using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. *J. Animal Sci.* 88, 3977–3983.
- Costa, R.G., Treviño, I.H., Medeiros, G.R., Medeiros, A.N., Pinto, T.F., Oliveira, R.L. 2010. Effects of replacing corn with cactus pear (*Opuntia ficus indica* Mill) on the performance of Santa Inês lambs. *Small Rumin Res.* 102, 13– 17.
- Chen, X. B., Gomes, M. J. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of technical details. Rowett Research Institute, Bucksburn.
- Dijkstra, D., Batista, L.H.C., Fabiano Neto, R., Godoy, M.M., Pessoa, F.O.A. 2016. Enterobacteriaceae no rúmen de borregas alimentadas com grãos de milho e de sorgo submetidos a diferentes processamentos. *Caderno de Ciências Agrárias.* 8, 41-47.
- Detmann, E.; Souza, M.A.; Valadares Filho, S.C., Queiroz, A.D., Berchielli, T.T., Saliba, E.O.S., Cabral, L.S., Pina, D.S., Ladeira, M.M., Azevedo, J.A. 2012. Métodos para análise de alimentos - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal. Suprema, Visconde do Rio Branco.
- Durmaz, H., Avci, M., Aygün, O. 2015. The Presence of *Listeria* Species in Corn Silage and Raw Milk Produced in Southeast Region of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 21, 41-44.
- Ellis, J.L., Bannink, A., Hindrichsen, I.K., Kinley, R.D., Pellikaan, W.F., Milora, N., Dijkstra, J. 2016. The effect of lactic acid bacteria included as a probiotic or silage inoculant on in vitro rumen digestibility, total gas and methane production. *Anim Feed Sci Tech.* 211, 61-74.
- Fortius, A.C.A., Ferreira, M.A., Bispo, S.V., Vêras, A.S.C., Salla, L.E., Chagas, J.C. 2014. Behavior of sheep fed different sequences of ingredients in a spineless cactus (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck) based-diet. *Rev. bras. saúde prod. anim.* 15, 74-82.
- Gebremariam, T., Melaku, S., Yami, A. 2006. Effect of different levels of cactus (*Opuntia ficus-indica*) inclusion on feed intake, digestibility and body weight gain in tef (*Eragrostis tef*) straw-based feeding of sheep. *Anim Feed Sci Tech.* 131, 42–51.

- Gouveia, L.N.F., Maciel, M.V., Soares, P.C., Neto, I.F.S., Gonçalves, D.N.A., Batista, Â.M.V., Carvalho, F.F.R. 2015. Perfil metabólico de ovinos em crescimento alimentados com dietas constituídas de feno ou silagem de maniçoba e palma forrageira. *Pesqui. Vet. Bras.* 35, 5-9.
- Guan, H., Yan, Y., Li, X., Li, X., Shuai, Y., Feng, G., Ran, Q., Cai, Y., Li, Y., Zhang, X. 2018. Microbial communities and natural fermentation of corn silages prepared with farm bunker-silo in Southwest China. *Bioresour. Technol.* 265, 282-290.
- Hall, M. B. 1998. Making nutritional sense of nonstructural carbohydrate. In: *Proceedings of the Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*. Florida University Press, Gainesville.
- Herrera, E., Murillo, M., Berumen, L., Soto- Cruz, N. O., Pérez-Lerma, J. B. 2017. Protein enrichment of *Opuntia ficus-indica* using *Kluyveromyces marxianus* in solidstate fermentation. *Cienc. investig. agrar.* 44, 113-120.
- Jobim, C.C., Reis, R.A., Schoken-iturrino, R.P., Rosa, B. 1999. Desenvolvimento de microrganismos durante autilização de silagens de grãos úmidos de milho e de espigas de milho sem brácteas. *Acta Sci.* 21, 671-676.
- Kafantaris, I., Kotsampasi, B., Christodoulou, V., Kokka, E., Kouka, P., Terzopoulou, Z., Gerasopoulos, K., Stagos, D., Mitsagga, C., Giavasis, I., Makri, S., Petrotos, K., Kouretas, D. 2016. Grape pomace improves antioxidant capacity and faecal microflora of lambs. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 101, 108-121.
- Kozloski, G.V., Trevisan, L.M., Bonnacarrère, L.M., Härter, C.J., Fiorentini, G., Galvani, D.B., Pires, C.C. 2006. Níveis de fibra em detergente neutro na dieta de cordeiros: consumo, digestibilidade e fermentação ruminal. *Arq Bras Med Vet Zoo.* 58, 893-900.
- Lara, E.C., Basso, F.C., Assis, F.B., Souza, F.A., Berchielli, T.T., Reis, R.A. 2016. Changes in the nutritive value and aerobic stability of corn silages inoculated with *Bacillus subtilis* alone or combined with *Lactobacillus plantarum*. *Anim Prod Sci.* 56, 1867–1874.
- Lopes, L.A., Carvalho, F.F.R., Cabral, A.M.D., Batista, Â.M.V., Camargo, K.S., Silva, J.R.C., Ferreira, J.C.S., Pereira Neto, J.D., Silva, J.L. 2017. Replacement of tifton hay with alfalfa hay in spineless cactus-based diets for dairy goats. *Small Rumin Res.*

- Ma, T., Tu, Y., Zhang, N. F., Deng, K. D., Diao, Q. Y. 2015. Effect of the Ratio of Non-fibrous Carbohydrates to Neutral Detergent Fiber and Protein Structure on Intake, Digestibility, Rumen Fermentation, and Nitrogen Metabolism in Lambs. *AsianAustralas J Anim Sci.* 28, 1419-1426.
- Macêdo, A.J.S., Santos, E.M., Araújo, G.G.L., Edvan, R.L., Oliveira, J.S., Perazzo, A.F., Sá, W.C.C.S., Pereira, D.M. 2018. Silages in the form of diet based on spineless cactus and buffelgrass. *Afr J Range For Sci.* 35, 121-129.
- Macêdo, A.J.S., Santos, E.M., Oliveira, J.S., Perazzo, A.F. 2017. Produção de silagem na forma de ração à base de palma: Revisão de Literatura. *Rev. electrón. vet.* 18, 1-11.
- Moreno, G.M.B., Silva Sobrinho, A.G., Leão, A.G., Loureiro, C.M.B., Perez, H.L., Rossi, R.C. 2010. Desempenho, digestibilidade e balanço de nitrogênio em cordeiros alimentados com silagem de milho ou cana-de-açúcar e dois níveis de concentrado. *Rev. Bras. Zootec.* 39, 4, 853-860.
- Monrroy, M., García, E., Ríos, K., García, J. R., 2017. Extraction and Physicochemical Characterization of Mucilage from *Opuntia cochenillifera* (L.) Miller. *J. Chem. Mokoboki*, K., Sebola, N., Matlabe, G. 2016. Effects of molasses levels and growing conditions on nutritive value and fermentation quality of *Opuntia cladodes* silage. *J. anim. plant sci.* 28, 4488-4495.
- Muck, R.E. 2010. Silage microbiology and its control through additives. *Rev. Bras. Zootec.* 39, 183-191. Ni, K., Yang, H., Hua, W., Wang, Y., Pang, H., 2016. Selection and characterisation of lactic acid bacteria isolated from different origins for ensiling *Robinia pseudoacacia* and *Morus alba* L. leaves. *J Integr Agric.* 15, 2353–2362.
- National Research Council - NRC., 2007. Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, cervids and new world camelids. National Academy Press, Washington.
- Nobre, I.S., Araújo, G.G.L., Santos, E.M., Carvalho, G.G.P., Souza, B.B., Ribeiro, O.L., Turco, S.H.N., Cavalcante, A.B., Albuquerque, I.R.R., 2018. Ingestive behavior and thermoregulation in sheep fed forage cactus silage undergoing intermittent water supply. *Semina: Ciênc. Agrár.* 39, 1683-1694.
- Ni, K., Wang, F., Zhu, B., Yang, J., Zhou, G., Pan, Y., Zhong, J., 2017. Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on the microbial community and fermentation quality of soybean silage. *Bioresour. Technol.* 238, 706-715.

Pinho, R.M.A., Santos, E.M., Oliveira, J.S., Carvalho, G.G.P., Silva, T.C., Macêdo, A.J. S., Correa, Y.R., Zanine, A.M., 2018. Does the level of forage neutral detergent fiber affect the ruminal fermentation, digestibility and feeding behavior of goats fed cactus pear? *Animal Sci. J.* 89, 1424-1431.

Pereira, T.C.J., 2012. Substituição do milho pelo farelo de algaroba em dietas peletizadas para cordeiros. Dissertation (Master in Ruminant Production) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga.

Ranjit, N, Kung, L., 2001. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *J Dairy Sci.* 84, 1149-1155.

Rosa, L.O., Pereira, O.G., Ribeiro, K.G., Valadares Filho, S.C., Cecon, P.R., 2018. Fermentation profile and microbial population in soybean silages with inoculant and powdered molasses. *Arq Bras Med Vet Zoo.* 70, 1586-1594.

Rodrigues, A.M., Pitacas, F.I., Reis, C.M.G., Blasco, M., 2016. Nutritional value of *Opuntia ficus-indica* cladodes from Portuguese ecotypes. *Bulg. J. Agric. Sci.* 22, 40-45.

Rosalinski-Moraes, F., Fernandes, F.G., Munaretto, A., de Oliveira, S., Wilmsen, M.O., Pereira, M.W., Meirelles, A.C.F., 2012. Método *famacha*®, escore corporal e de diarreia como indicadores de tratamento anti-helmíntico seletivo de ovelhas em reprodução. *Biosci. j.* 28, 1015-1023.

Stanford, K., Bach, S., Baah, J., Mcallister, T., 2014. A Mixture of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, and *Paenibacillus polymyxa* Reduces *Escherichia coli* O157:H7 in Finishing Feedlot Cattle. *J Food Prot.* 77, 5, 738-744.

Sá, W.C.C.S., Santos, E.M., Oliveira, J.S., Perazzo, A.F., 2018 Production of spineless cactus in Brazilian Semiarid, in: Edvan R.L. (Ed.), *New perspectives in forage crops*. Publisher: InTech, Chapters published.

Sousa, N.M., Oliveira, J.S., Silva, D.S., Santos, E.M., Medeiros, A.N., Ramos, J.P.F., Brito, E.A., 2018. Levels of neutral detergent fiber in diets with forage palm for dairy goats. *Arq Bras Med Vet Zoo.* 70, 1595-1604.

Vazquez-Mendoza, P., Miranda-Romero, L.A., Aranda-Osorio, G., Burgueño-Ferreira, J.A., Salem, A.Z.M., 2016. Evaluation of eleven Mexican cultivars of prickly pear cactus trees for possibly utilization as animal feed: in vitro gas production. *Agroforest Syst.* 91, 749-756.

Valadares, R.F.D., Broderick, G.A., Valadares Filho, S.C., 1999. Effect of replacing alfalfa with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *J Dairy Sci.* 82, 2686-2696.

Weinberg, Z.G., Muck, R.E., Weimer, P.J., Chen, Y., Gamburg, M. 2004. Lactic Acid Bacteria Used in Inoculants for Silage as Probiotics for Ruminants. *Appl Biochem Biotechnol.* 118, 1-9.

Zheng, M.L., Niu, D.Z., Jiang, D., Zuo, S.S., Xu, C. C. 2017. Dynamics of microbial community during ensiling direct-cut alfalfa with and without LAB inoculant and sugar. *J Appl Microbiol.* 122, 1456-1470.

Tabela 1- Composição bromatológica dos ingredientes utilizados para compor as dietas experimentais

Item(g/kg de MS)	PF1	PF2	SPF	SPFI	F.Tifton 85	F.Milho	F. soja
MS	144,6	144,9	144,5	153,1	892,3	894,8	891,8
MO	905,50	916,4	922,5	910,5	922,0	960,5	932,8
MM	94,4	83,5	77,4	89,4	73,5	37,5	67,1
PB	42,8	36,2	25,9	32,1	58,2	115,1	434,4



EE	8,0	6,7	12,3	14,5	16,3	152,4	24,1
FDN	221,5	236,2	239,8	240,4	754,6	331,5	140,5
FDNcp	236,5	236,4	241,7	233,9	730,1	328,5	115,3
FDA	134,3	149,3	146,4	142,2	352,8	102,7	74,7
Celulose	116,6	124,8	116,8	120,6	280,6	86,1	72,8
Hemicelulose	77,3	79,9	100,1	96,3	393,9	232,3	83,7
Lignina	17,7	24,5	29,6	21,6	66,8	16,6	1,9
Cinzas	94,4	83,5	77,4	89,4	77,9	39,4	67,1

PF1 = Palma forrageira *in natura* processada na hora do fornecimento; PF2 = palma forrageira processada pela manhã; SPF = silagem de palma sem inoculante; SPFI = silagem de palma com inoculante microbiano; F. Tifton - 85= feno de capim Tifton-85; F.milho=farelo de milho; f.soja=farelo de soja; MS=Matéria Seca; MO=Matéria orgânica; MM; Matéria mineral; PB=Proteína bruta; EE=Extrato etéreo; FDN=Fibra em detergente neutro; FDNcp=Fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína FDA=Fibra em detergente ácido.

Tabela 2- Proporções dos ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais utilizadas na alimentação de ovinos alimentados com palma forrageira *in natura* e silagem com e sem inoculante

Item, g/kg (MS)	Dietas			
	PF1	PF2	SPF	SPFI
PF1	0,0	474,2	0,0	0,0
PF2	474,2	0,0	0,0	0,0

SP	0,0	0,0	474,2	0,0
SPI	0,0	0,0	0,0	474,2
Feno de Tifton-85	126,1	126,1	126,1	126,1
Farelo de milho	204,1	204,1	204,1	204,1
Farelo de soja	166,0	166,0	166,0	166,0
Ureia	6,5	6,5	6,5	6,5
Suplemento mineral	14,2	14,2	14,2	14,2
Cloreto de amônia	8,3	8,3	8,3	8,3
Sulfato de amônia	0,7	0,7	0,7	0,7
Composição química, g/kg de MS				
Matéria seca*	177,4	177,7	185,0	184,6
Matéria orgânica	832,9	848,3	848,5	849,9
Proteína bruta	107,1	101,9	91,3	97,6
Extrato etéreo	37,4	35,7	44,3	47,8
Fibra em detergente neutro	438,6	440,4	444,4	444,2
Carboidratos não-fibrosos	249,8	290,3	263,3	260,3
Fibra em detergente ácido	233,8	235,9	236,5	235,9

\*g/ kg<sup>-1</sup> de MV; PF1 = Palma forrageira *in natura* processada na hora do fornecimento; PF2 = palma forrageira processada pela manhã; SPF = silagem de palma sem inoculante; SPFI = silagem de palma com inoculante microbiano.

Tabela 3- Consumo de nutrientes por ovinos alimentados com palma *in natura* e silagem de palma forrageira

Item	Dietas				
	PF1	PF2	SPF	SPFI	EPM
	gramas/dia				
Matéria seca	631,34 b	601,77b	727,83a	750,80a	30,38
Matéria orgânica	522,77b	506,83b	607,48a	633,91a	25,89

Proteína Bruta	67,71	60,76	66,21	72,04	3,12
FDN	281,50ac	269,39c	329,08ab	338,40b	12,86
Extrato etéreo	24,04b	21,68b	33,59a	36,64a	1,20
CNF	149,52a	154,99ab	178,60ab	186,82a	9,03
NDT	456,85b	426,03b	559,80a	561,85a	20,75
gramas/ quilo de peso corporal					
Matéria seca (g/kg PC)	25,81	24,77	30,25	31,07	1,77
FDN (g/kg de PC)	11,51	11,08	13,65	14,01	0,74

PF1 = Palma forrageira *in natura* processada na hora do fornecimento; PF2 = palma forrageira processada pela manhã; SPF = silagem de palma sem inoculante; SPFI = silagem de palma com inoculante microbiano. Letras diferentes nas linhas significam médias diferentes ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey

Tabela 4- Coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes (g/kg) de dietas com palma forrageira *in natura* e silagem de palma forrageira com e sem inoculante para ovinos SPRD

Item (g/kg)	Dietas				
	PF1	PF2	SPF	SPFI	EPM
Matéria seca	836,54ab	804,64b	862,84a	826,11b	9,00
Matéria orgânica	826,00ab	798,32b	860,29a	822,98ab	9,75
Proteína Bruta	843,59	808,52	824,79	796,17	13,60
Fibra em detergente neutro	801,52	786,63	834,93	803,75	12,27

Extrato etéreo	855,48	853,03	902,47	881,55	12,27
Carboidrato não fibrosos	859,32ab	801,26b	913,74a	856,68ab	23,79
Nutrientes digestíveis totais	724,73bc	708,95c	769,93a	748,55ab	8,38

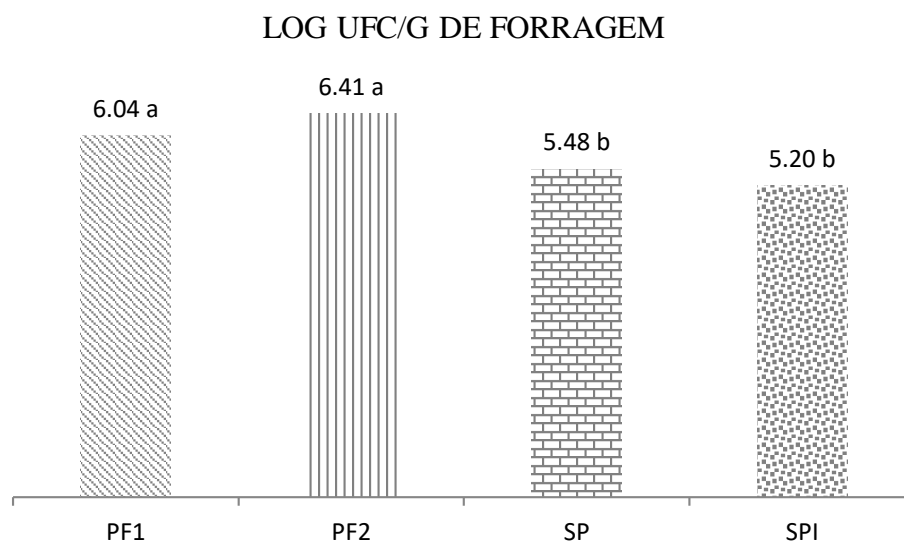
PF1 = Palma forrageira *in natura* processada na hora do fornecimento; PF2 = palma forrageira processada pela manhã; SPF = silagem de palma sem inoculante; SPFI = silagem de palma com inoculante microbiano. Letras diferentes nas linhas significam médias diferentes ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey

Tabela 5- Balanço nitrogenado e síntese de proteína microbiana em ovinos alimentados com palma *in natura* e silagem de palma forrageira

Item	Dietas				
	PF1	PF2	SPF	SPFI	EPM
Nitrogênio ingerido (g/dia)	8,66	8,12	9,26	8,72	0,80
Nitrogênio nas fezes (g/dia)	1,33	1,54	1,62	1,70	0,23
Nitrogênio urina (g/dia)	0,19	0,37	0,38	0,27	0,07
Nitrogênio retido (g/dia)	7,16	6,21	7,25	6,74	0,62
Produção microbiana (g/dia)					

Nitrogênio microbiano	4,92	5,74	4,13	4,94	0,91
PB-microbiana	30,73	35,88	25,82	30,91	5,71
Eficiência microbiana					
g PB/kg NDT	82,64	100,95	55,03	72,09	16,49

PF1 = Palma forrageira *in natura* processada na hora do fornecimento; PF2 = palma forrageira processada pela manhã; SPF = silagem de palma sem inoculante; SPFI = silagem de palma com inoculante microbiano. Letras diferentes nas linhas significam médias diferentes ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey



PF1 = Palma forrageira *in natura* processada na hora do fornecimento; PF2 = palma forrageira processada pela manhã; SP = silagem de palma sem inoculante; SPI = silagem de palma com inoculante microbiano. Letras diferentes significam efeito ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Gráfico 1- Contagem de enterobactérias nas fezes dos ovinos alimentados com palma *in natura* e silagem de palma forrageira